

VISIT...

LANZAROTE  
*Caliente*.COM

*Г.А. Кочетов*

# ТИАМИНОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ

577  
K75



Издание 1977 г. Издательство „Наука“

АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРОБЛЕМАМ  
БИОХИМИИ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА  
ОРДЕНА ЛЕНИНА  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А. Н. БАХА

*Г. А. Кочетов*

# ТИАМИНОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ



---

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»  
МОСКВА 1978

**Кочетов Г. А. Тиаминовые ферменты.** М., «Наука», 1978, 234 с.

Обобщены литературные данные, а также результаты собственных исследований автора и его сотрудников о свойствах тиаминовых ферментов — основных участников многих важнейших биохимических процессов. Приведены характеристика реакций, катализируемых тиаминовыми ферментами, и механизм их действия. Рассмотрена структура белкового компонента, его функциональные группы, взаимодействие кофакторов с апоферментом, специфика формирования активного центра. Значительное место уделено вопросам регуляции каталитического действия тиаминовых ферментов, возможной взаимосвязи их (структурной и функциональной) с другими ферментными системами.

Книга может быть полезна для научных сотрудников, работающих в области общей и медицинской биохимии, энзимологии, молекулярной биологии и физиологии, а также для аспирантов и студентов старших курсов.

Табл. 19. Ил. 60. Список лит. 560 назв.

Ответственный редактор  
академик С. Е. СЕВЕРИН



## ВВЕДЕНИЕ

Тиаминовые ферменты катализируют значительное количество реакций. Их, однако, можно свести к нескольким основным типам (за одним исключением, о котором будет сказано ниже): декарбоксилирование  $\alpha$ -кетокислот, расщепление  $\alpha$ -оксикетонов или  $\alpha$ -дикетонов. Во всех случаях коферментную функцию выполняет тиаминпирофосфат.

Энзиматическое декарбоксилирование  $\alpha$ -кетокислот впервые описано в 1911 г. [372], когда было показано, что экстракт из дрожжей расщепляет пировиноградную кислоту с образованием углекислого газа и уксусного альдегида. Декарбоксилирование не наблюдалось, если дрожжи предварительно промывали щелочным раствором фосфатного буфера. Оно восстанавливалось при последующем добавлении в систему прокипяченного дрожжевого экстракта. Термостабильное органическое соединение, необходимое для энзиматического декарбоксилирования пирувата и названное кокарбоксилазой, было впоследствии выделено из дрожжей и идентифицировано как тиаминпирофосфат [79, 80, 331].

В настоящее время тиаминовые ферменты обнаружены во всех исследованных органах и тканях животных, а также в растениях и у микроорганизмов. С каждым годом все новые представители данной группы ферментов обнаруживаются в природе, идентифицируются, выделяются и исследуются [81, 128, 137—139, 156, 190, 198, 223, 276, 341, 350, 375, 485]. Тиаминовые ферменты принимают самое широкое участие в общем обмене веществ в организме. Оксоглутаратдегидрогеназа, катализирующая окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, является непрямым участником цикла

трикарбоновых кислот. С окислением  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты сопряжена реакция субстратного фосфорилирования, приводящая к образованию высокоэнергетических фосфорных соединений: гуанозинтрифосфорной кислоты — в животных тканях и АТФ — в растениях.

Пируватдегидрогеназа осуществляет окислительное декарбоксилирование пирувата (продукт гликолиза) с образованием ацетил-КоА, который затем может включаться в цикл трикарбоновых кислот. Таким образом, осуществляется взаимосвязь двух важнейших путей обмена углеводов в клетке.

Транскетолаза (фермент пентозного пути превращения углеводов) обеспечивает взаимопревращение фосфосахаров с длиной цепочки от одного до восьми углеродных атомов; кроме того, непосредственно участвует в процессах фотосинтеза.

Если учесть, что в результате действия тиаминовых ферментов образуются такие вещества, как ацил-КоА, ацил-фосфат, рибозо-5-фосфат, восстановленные формы НАД, НАДФ, то становится понятной та роль, которую играют эти ферменты в общем обмене веществ в клетке, в частности, в синтезе нуклеиновых и жирных кислот, различных коферментов и других биологически важных соединений. Несмотря на многообразие реакций, катализируемых тиаминовыми ферментами, между ними наблюдается много общего. Это относится, прежде всего, к начальным этапам реакций и заключается в том, что во всех случаях в результате разрыва  $\text{—C—C—}$  связи субстрата образуется остаток альдегида, более или менее прочно связанный с коферментом.

Этот остаток затем может отщепляться в виде свободного альдегида, окисляться и давать ацил-производное КоА или переноситься на соответствующий субстрат-акцептор. Путь, по которому пойдет дальнейшее превращение остатка альдегида, связанного с коферментом, будет зависеть от природы белка-фермента, с которым связан кофермент.

Единственное пока исключение из общего правила — сульфолиаза — новый тиаминовый фермент, недавно обнаруженный японскими исследователями [300, 301]. Этот фермент катализирует расщепление сульфоацетальдегида с образованием уксусной кислоты и сульфита. Существенно то, что в данном случае субстратом, подвер-

гающимся расщеплению, является альдегид и, кроме того, в результате ферментативной реакции происходит расщепление не  $\text{—C—C—}$  связи, что характерно для всех остальных тиаминовых ферментов, а  $\text{—C—S—}$  связи.

В последнее время достигнуты определенные успехи в изучении механизма действия тиаминовых ферментов. Использование модельных систем позволило постулировать возможную схему последовательных реакций, протекающих при осуществлении тиаминпирофосфатом его каталитической функции. Некоторые из этих реакций удалось осуществить в опытах с ферментами, показав таким образом их реальность в условиях ферментативного катализа.

До сих пор, однако, еще очень мало известно о строении активного центра тиаминовых ферментов, о взаимодействии кофермента с апоферментом, о тех функциональных группах тиаминпирофосфата, которые участвуют в связывании с белком и в осуществлении собственного каталитического акта. Еще меньше данных имеется об общей структуре ферментов, об их функциональных группах, возможных путях регуляции каталитической активности.

Пожалуй, одними из первых тиаминовых ферментов, которые начали систематически изучаться, были дегидрогеназы  $\alpha$ -кетокислот — пируватдегидрогеназа и оксоглутаратдегидрогеназа. Правильнее их называть, соответственно, пируватдегидрогеназный комплекс и оксоглутаратдегидрогеназный комплекс, так как каждый из них состоит из трех индивидуальных ферментов — собственно декарбоксилирующего фермента, липонилтрансацилазы и липонилдегидрогеназы, последовательно катализирующих окислительное декарбоксилирование соответствующей кетокислоты до ацил-КоА. Основные усилия исследователей до последнего времени были направлены на изучение общей структуры указанных комплексов, количественного соотношения белковых компонентов, входящих в их состав, природы кофакторов, участвующих в осуществлении ферментативного катализа, расшифровки отдельных стадий процесса превращения субстрата. В этом плане достигнуты определенные успехи. Использование электронного микроскопа позволило получить сведения об общей геометрии комплексов. Мягкими воздействиями, не нарушающими белковую структуру, уда-

лось расчленить комплексы на составляющие их компоненты с сохранением индивидуальной ферментативной активности отдельных компонентов. Последующая реассоциация восстанавливает первоначальную структуру комплексов и их каталитические свойства. Значительно меньшими сведениями мы располагаем о свойствах индивидуальных ферментов, входящих в состав комплексов. Особенно это относится к декарбоксилазному компоненту, который, собственно, и является тиаминовым ферментом. Наиболее интенсивно и плодотворно данные вопросы в настоящее время исследуются в лабораториях С. Е. Северина и Л. Рида.

Обширная литература посвящена пируватдекарбоксилазе, выделенной из дрожжей. Изучением свойств данного фермента занимались в основном Хольцер, Ульрих, Шелленбергер и их сотрудники.

Транскетолаза, открытая около двух десятилетий назад одновременно в двух лабораториях — Рекера [194, 393, 396] и Хореккера [244, 245, 246, 249, 250], — интересовала исследователей в первую очередь с точки зрения ее участия в функционировании пентозного цикла, нового, до того времени неизвестного пути обмена углеводов. Фермент был выделен в чистом виде из пекарских дрожжей, частично очищен из шпината, ткани печени и в общих чертах охарактеризован. Затем вопрос этот, с точки зрения структуры и функции фермента, был предан забвению, систематически не исследовался, и только эпизодически появлялись в литературе отдельные сообщения. Однако за последнее время интерес к транскетолазе вновь стал пробуждаться, и появились работы, выполненные в лабораториях Швейцарии, Японии и США. Наши собственные исследования по структуре и функции данного фермента проводятся примерно на протяжении последних 15 лет.

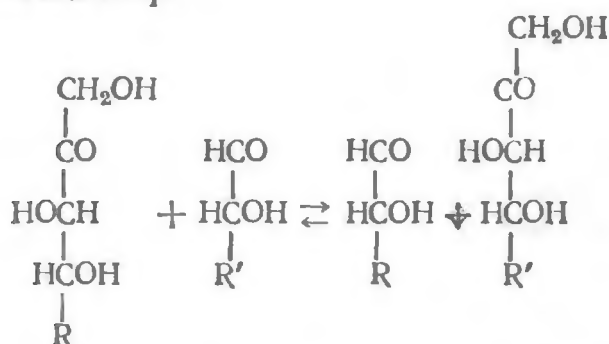
В настоящей монографии мы попытались суммировать литературные и собственные экспериментальные данные относительно общей структуры тиаминовых ферментов, механизма катализируемых ими реакций, функциональных групп, специфики взаимодействия апофермента с кофакторами, формирования активного центра, регуляции ферментативной активности и некоторых других вопросов.

Мы совершенно не касаемся клинических вопросов, в частности — особенностей функционирования тиаминовых ферментов при различных патологических состояниях организма. Это не входило в нашу задачу. Следует, однако, указать, что целый ряд патологических состояний организма сопровождается существенными изменениями активности тиаминовых ферментов в органах и тканях, а тиаминпирофосфат (препарат «кокарбоксилаза») широко применяется в медицине как терапевтическое средство при многих заболеваниях. В частности, показана его высокая эффективность при лечении ревматизма и некоторых болезней сердца. Этот аспект проблемы успешно исследуется в лаборатории Ю. М. Островского и неоднократно обсуждался автором в его монографиях [39, 42] и специальных сборниках [40, 41].

## Глава первая

# КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАКЦИЙ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ТИАМИНОВЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

**Транскетолаза** (седогептулоза-7-фосфат: D-глицеральдегид-3-фосфат-гликольальдегидтрансфераза, КФ, 2.2.1.1.) катализирует расщепление и образование кетосоединений путем переноса двууглеродного фрагмента (гликолевого альдегида) с субстрата-донора на субстрат-акцептор:

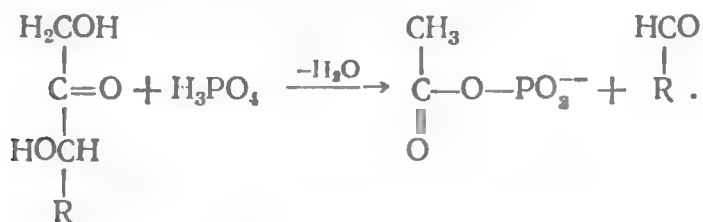


Донорами являются кетосахара с гидроксильными группами при С-3 и С-4 в *транс*-положении (исключение составляет оксипируват). Функцию акцептора выполняют альдосахара. Как правило, фосфорилирование сахаров по последнему углеродному атому резко повышает их эффективность в качестве субстратов. Длина углеродной цепочки (до определенного предела) существенной роли не играет. Наибольшая скорость транскетолазной реакции наблюдается с ксилулозо-5-фосфатом, фруктозо-6-фосфатом, седогептулозо-7-фосфатом (субстраты-доноры) и D-глицеральдегид-3-фосфатом, D-эритрозо-4-фосфатом, D-рибозо-5-фосфатом (субстраты-акцепторы). Другие субстраты — доноры: оксипируват, L-эритрулоза, D-ксилулоза, октулозо-8-фосфат; акцепторы: формальдегид, гликольальдегид, глицеральдегид, D-дезоксирибозо-5-фосфат, аллозо-6-фосфат, глюкозо-6-

фосфат, D-арабинозо-5-фосфат [243, 247, 283, 308, 394, 397, 399, 483].

Транскетолазная реакция обратима за исключением того случая, когда одним из субстратов является оксипироват. Заметим также, что диоксиацетон — продукт транскетолазной реакции, образующийся из оксипировата и формальдегида, не подвергается действию транскетолазы.

**Фосфокетолаза** [D-ксилулозо-5-фосфат-D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза (ацетилирующая фосфат), КФ 4.1.2.9] катализирует, в присутствии неорганического фосфата, расщепление ксилулозо-5-фосфата и фруктозо-6-фосфата. Продукты реакции — ацетил-фосфат и, соответственно, глицеральдегид-3-фосфат или эритрозо-4-фосфат [174, 209, 239, 451, 533]:



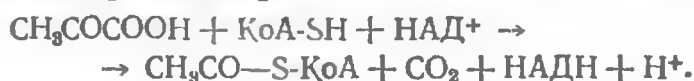
При замене фосфата арсенатом вместо ацетил-фосфата образуется ацетат. В искусственных условиях, с использованием феррицианида в качестве акцептора электронов, продуктом фосфокетолазной реакции является гликолевая кислота.

Фермент действует на те же субстраты, что и транскетолаза, и разрывает ту же — С—С-связь, однако судьба двууглеродного фрагмента, образующегося в процессе реакции, различна. В случае транскетолазы он переносится на альдегид-акцептор, а в фосфокетолазной реакции сначала, очевидно, происходит его превращение в ацетильную группу, а затем взаимодействие с неорганическим фосфатом и образование ацетил-фосфата. Кроме того, в противоположность транскетолазе, реакция, катализируемая фосфокетолазой, необратима.

Фосфокетолаза обнаружена у микроорганизмов. Характеризуется высокой степенью специфичности. Так, фермент, выделенный из *Acetobacter xylinum* [395, 451] и *Leuconostoc mesenteroides* [174, 258], расщепляет D-ксилулозо-5-фосфат и D-фруктозо-6-фосфат, но не действует на другие субстраты. А фермент, очищенный из *Lac-*

*tobacillus plantarum*, активен только с D-ксилулозо-5-фосфатом [209].

Пируватдегидрогеназный комплекс катализирует окислительное декарбоксилирование пирувиноградной кислоты [408, 426]:



Процесс включает в себя ряд последовательных стадий, катализируемых тремя индивидуальными ферментами, объединенными в комплекс, который имеет упорядоченную, строго организованную структуру [188, 206, 265, 304—306, 410, 411]. Кофакторами являются тиаминпирофосфат, КоА, ФАД, НАД и липоевая кислота. Первая стадия процесса (взаимодействие субстрата с комплексом и последующее декарбоксилирование) осуществляется тиаминовым ферментом — пируватдекарбоксилазой.



Стадия эта необратима и является, по-видимому, лимитирующей [412]. Восстановительное ацетилирование липоевой кислоты (реакция 2) катализируется, по всей видимости, тем же ферментом [84, 419, 456]. Экспериментальные данные указывают на то, что образование ацетильного остатка происходит на уровне тиаминпирофосфата, и уже затем он переносится на липоевую кислоту [132, 263, 313, 314, 414, 427]. Последняя связана ковалентно с липоилтрансацетилазой за счет своей карбоксильной группы и ε-аминогруппы остатка лизина белка [369, 370]. Липоилтрансацетилаза обеспечивает перенос ацетильного остатка с липоевой кислоты на ацетил-КоА (реакция 3). Последний этап — окисление восстановленной формы липоевой кислоты (реакция 4) — катализируется флавиновым ферментом — липоилдегидрогеназой. Функцию акцептора водорода выполняет НАД. Фермент содержит в составе своей молекулы активный дисульфид, который также участвует в реакции окисления [344—347, 380, 462, 463].



Ферменты, входящие в состав пируватдегидрогеназного комплекса, связаны нековалентными связями, причем пируватдекарбоксилаза и липоилдегидрогеназа не взаимодействуют между собой, но оба связываются с липоилтрансацилазой [206, 262, 329, 336]. Этот фермент, таким образом, выполняет не только каталитическую функцию, но и структурную.

Пируватдекарбоксилаза, как в изолированном виде, так и в составе комплекса, способна осуществлять окислительное декарбоксилирование пирувата при добавлении в инкубационную среду искусственных акцепторов электронов, например, феррицианида, дихлорфенолиндифенола или метиленового синего [132, 189, 263, 296, 428, 458]. При этом происходит образование  $\text{CO}_2$  и уксусной кислоты; функцию акцептора ацетила в данном случае выполняет вода. В искусственных условиях можно было наблюдать индивидуальные реакции, катализируемые и двумя другими ферментами комплекса — липоилтрансацилазой и липоилдегидрогеназой [343].

Пируватдегидрогеназный комплекс катализирует окислительное декарбоксилирование не только пирувата, но и  $\alpha$ -кетобутирата и  $\alpha$ -кетовалериата, хотя и со значительно меньшей скоростью [226, 269], а также, возможно,  $\alpha$ -кетоизокапроата и  $\alpha$ -кетокапроата [269, 293]. Кроме окислительного декарбоксилирования указанных  $\alpha$ -кетокислот, пируватдегидрогеназный комплекс способен осуществлять образование ацетона [181, 226, 263, 366]:



ацетолактата [226, 238, 267]:



и дисмутацию диацетила [181, 263]:



Впервые в высокоочищенном состоянии пируватдегидрогеназный комплекс был выделен из грудной мышцы голубя [263, 459]. В настоящее время он получен из *E. coli* [143, 295, 297, 298], дрожжей [226], почек и сердца быка [262, 327, 328, 329], сердца [204, 208], печени [328] и мозга [475] свиньи, из *Neurospora crassa* [201].

Препараты пируватдегидрогеназного комплекса, даже выделяемые из одного и того же источника, имели

разный коэффициент седиментации и в ряде случаев существенно различались по величине молекулярного веса [204, 203, 226, 293, 327]. Это объясняется тем, что в процессе выделения комплекса от него могут частично отщепляться составляющие его компоненты. Так, например, ферментативная активность и коэффициент седиментации пируватдегидрогеназного комплекса, выделенного из сердечной мышцы свиньи, значительно увеличивались после его предварительной инкубации со свободной пируватдекарбоксилазой [206]. Аналогичная возможность (отщепление от пируватдегидрогеназного комплекса в процессе его выделения) предполагается и для липоилдегидрогеназного компонента [84]. Поэтому в настоящее время трудно говорить об абсолютной величине молекулярного веса пируватдегидрогеназных комплексов, выделенных из разных источников. Ясно лишь то, что он равен нескольким миллионам (комплексы, выделенные из животных тканей, имеют молекулярный вес 7—8 млн., а комплексы из микроорганизмов — около 4 млн.).

Разобращение пируватдегидрогеназного комплекса на составляющие его компоненты и затем реконструкцию с восстановлением его исходных свойств (макромолекулярной структуры и каталитической активности) впервые удалось осуществить с препаратами из *E. coli* [298] и с мультиэнзимным комплексом, выделенным из сердечной мышцы свиньи [206, 207, 292]. Сейчас в большей или меньшей степени это сделано с пируватдегидрогеназными комплексами, изолированными и из других источников [7, 8, 66]. Согласно последним данным [150], пируватдегидрогеназный комплекс из *E. coli* имеет мол. вес около 4 600 000 и при соответствующей обработке распадается на одну молекулу липоилтрансацетилазы (мол. вес 1 700 000, 24 полипептидные цепи, 24 ковалентно связанных остатка липоевой кислоты), 12 молекул пируватдекарбоксилазы (мол. вес 192 000, по-видимому, две полипептидные цепи на молекулу) и шесть молекул липоилдегидрогеназы (мол. вес 112 000, две полипептидные цепи на молекулу).

Приведенные данные величины молекулярного веса комплекса и количественного содержания в нем отдельных ферментов являются, по-видимому, наиболее точными, тем не менее по причине, о которой говорилось выше,

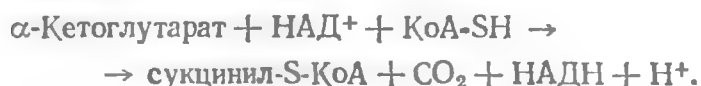
нельзя безоговорочно считать, что они относятся к нативному комплексу.

Несколько особняком стоит пируватдегидрогеназный комплекс, выделенный из *Azotobacter vinelandii* [107, 178]. Он имеет сравнительно низкий мол. вес — порядка 1 000 000. В его состав входят восемь молекул пируватдекарбоксилазы (мол. вес каждой равен 89 000), одна молекула липонилдегидрогеназы, состоящая из двух субъединиц (мол. вес субъединицы — 56 000) и два типа молекул липонилтрансацилазы: четыре с мол. весом 82 000 и две — с мол. весом 59 000. Последние два значения мол. веса, как полагают авторы, несколько завышены.

Пируватдегидрогеназный комплекс из *Azotobacter vinelandii*, кроме обычной последовательности реакций, приводящей к окислительному декарбоксилированию пировиноградной кислоты с образованием ацетил-КоА, способен, в присутствии молекулярного кислорода, осуществлять непосредственное превращение пирувата в уксусную кислоту:  $\text{пируват} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{CO}_2 + \text{ацетат}$ . Для протекания этой реакции необходимо лишь наличие тиаминпирофосфата и ионов магния. Добавления КоА и НАД<sup>+</sup> не требуется. Ответствен за осуществление указанной реакции, по-видимому, только пируватдекарбоксилазный компонент пируватдегидрогеназного комплекса [107].

Заметим, что наличие побочной реакции окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты, приводящее в аэробных условиях к образованию ацетата, отмечалось и раньше при работе с пируватдегидрогеназными комплексами, выделенными из *Mycobacterium tuberculosis* [176] и грудной мышцы голубя [263].

Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс катализирует окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты. Продуктами реакции являются сукцинил-КоА и  $\text{CO}_2$ :



Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс характеризуется высокой степенью специфичности и действует, по-видимому, только на  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту [227, 269]. Препарат, выделенный из пекарских дрожжей, по-

казывал невысокую активность и с  $\alpha$ -кетоадипиновой кислотой [225]. Но он не был гомогенным, и наблюдавшаяся активность могла быть обусловлена примесными белками. Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс имеет много общего с пируватдегидрогеназным комплексом. Он катализирует ту же последовательность реакций и также состоит из трех индивидуальных ферментов (оксоглутаратдекарбоксилазы, липоилтрансукцинилазы и липоилдегидрогеназы), химизм действия которых, очевидно, тот же самый, что и у соответствующих ферментов пируватдегидрогеназного комплекса. Интересно в связи с этим, что флавопротеиновые компоненты обоих комплексов взаимозаменяемы. Например, липоилдегидрогеназа, выделенная из пируватдегидрогеназного комплекса, может при реконструкции включаться в оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (и наоборот) без нарушения его каталитических свойств [364, 413, 449]. Два других фермента — декарбоксилаза и липоилтрансацетилаза — такой способностью не обладают. Липоилтрансукцинилаза в оксоглутаратдегидрогеназном комплексе, так же как липоилтрансацетилаза в пируватдегидрогеназном комплексе, кроме каталитической выполняет и структурную функцию.

В противоположность пируватдегидрогеназному комплексу оксоглутаратдегидрогеназный комплекс изучен значительно хуже. Выделен он в настоящее время из *E. coli* [297, 319], сердечной мышцы свиньи [208, 227, 344, 428] и крысы [423], почек быка [262], грудной мышцы голубя [49], из цветной капусты [388] и пекарских дрожжей [225]. Мол. вес комплексов находится в пределах 2—3 млн.

Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс из *E. coli* был разобшен на составляющие его компоненты, а затем реконструирован [364]. Комплекс из грудной мышцы голубя удалось разделить на две фракции, одна из которых представляла собой липоилдегидрогеназу, а вторая — субкомплекс оксоглутаратдекарбоксилазы с липоилтрансукцинилазой [49]. При смешивании этих фракций восстанавливалась способность к осуществлению полной последовательности реакций окисления  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, свойственная нативному оксоглутаратдегидрогеназному комплексу. Оксоглутаратдекарбоксилаза из оксоглутаратдегидрогеназного комплекса грудной мыш-

цы голубя в настоящее время получена в высокоочищенном состоянии [49].

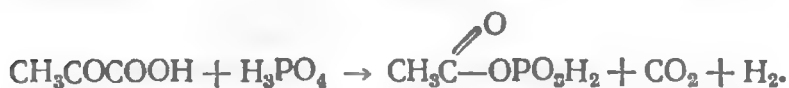
*Пируватдекарбоксилаза* (карбокси-лиаза-2-оксокислот, КФ 4.1.1.1) катализирует реакцию простого декарбоксилирования пировиноградной кислоты с образованием уксусного альдегида и  $\text{CO}_2$ :



Действует она и на некоторые другие  $\alpha$ -кетокислоты. Простое декарбоксилирование характерно главным образом для микроорганизмов, в частности для дрожжей, которые затем могут восстанавливать образовавшийся альдегид в спирт.

Из всей группы тиаминовых ферментов, осуществляющих декарбоксилирование пировиноградной кислоты, пируватдекарбоксилаза единственный фермент, в результате действия которого образующийся альдегид выделяется в среду в свободном виде. Во всех остальных случаях для нормального протекания ферментативной реакции требуется присутствие соответствующего акцептора двууглеродного остатка. При наличии в среде высокой концентрации ацетальдегида двууглеродный фрагмент, образующийся из пирувата в пируватдекарбоксилазной реакции, может переноситься на ацетальдегид с образованием ацетоина [233, 477]. Однако этот процесс идет значительно медленнее, чем нормальное расщепление пирувата до ацетальдегида и  $\text{CO}_2$ .

*Пируват: формиатлиаза* [274, 275, 367, 500] и *пируват: ферридоксин-оксидоредуктаза* [88, 401, 402, 522—524] катализируют фосфорокластическое расщепление пирувата с образованием ацетилфосфата. Кроме того, продукты реакции в первом случае — муравьиная кислота, а во втором — молекулярный водород и  $\text{CO}_2$ :



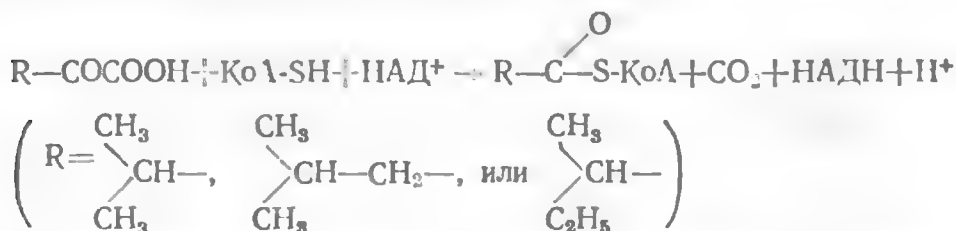
Для действия обоих ферментов необходимо, по-видимому, наличие  $\text{CoA}$ .

Начальные этапы реакции, катализируемой пируват: формиатлиазой, обратимы, так как в присутствии фер-

мента наблюдается интенсивный обмен между меченным по углероду формиатом и карбоксильной группой субстрата. Последующие стадии (или какая-либо одна из них) необратимы, так как в тех же условиях инкубации не происходило включения метки в пируват из меченных по углероду ацетил-фосфата или ацетил-КоА.

Формиат — непосредственный продукт ферментативной реакции, катализируемой пируват: формиатлиазой. С другой стороны, он не образуется в качестве промежуточного продукта в реакции, катализируемой пируват: ферридоксин-оксидоредуктазой. Оба вышеуказанных фермента, осуществляющие фосфорокластическое расщепление пирувата, найдены в микроорганизмах.

$\alpha$ -Кетоизовалериатдегидрогеназа, выделенная из *Bacillus subtilis*, катализирует окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетокислот с разветвленной цепью, таких, как  $\alpha$ -кетоизовалериановая,  $\alpha$ -кетоизокапроновая и  $\alpha$ -кето- $\beta$ -метилвалериановая кислоты [368]:



Как и при окислительном декарбоксилировании  $\alpha$ -кетокислот с неразветвленной цепью, продуктами реакции являются  $\text{CO}_2$ , восстановленный НАД и соответствующий ацил-КоА.

Ацетолактатсинтетаза катализирует конденсацию двух молекул пировиноградной кислоты с образованием  $\alpha$ -ацетолактата:



Реакция идет таким образом, что вначале одна молекула пирувата декарбоксилируется, в результате чего образуется остаток ацетальдегида, связанный с тиаминпирозинфосфатом. Затем он конденсируется со второй молекулой субстрата с образованием ацетолактата. Акцептором двууглеродного остатка может служить не только пировиноградная кислота, но и  $\alpha$ -кетомасляная. В этом случае образуется  $\alpha$ -ацето- $\alpha$ -оксимасляная кислота. Фермент обнаружен в растениях [356] и у микроорга-

низмов [86, 117, 145, 197, 199, 321, 400, 431, 488, 520, 521, 525].

Продукты ацетолактатсинтетазной реакции —  $\alpha$ -ацетолактат и  $\alpha$ -ацето- $\alpha$ -оксимасляная кислота — служат исходными субстратами для синтеза соответственно валина и изолейцина [11].

*Пируватдегидрогеназа* (пируват: цитохром  $b_1$ -оксидоредуктаза, КФ 1.2.2.2), флавиносодержащий фермент, катализирует в присутствии цитохрома  $b_1$  окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием  $\text{CO}_2$  и свободной уксусной кислоты:



Выделена из мутантного штамма *E. coli* [251].

*Сульфоацетальдегид: сульфолиаза* катализирует расщепление сульфоацетальдегида с образованием уксусной кислоты и сульфита [299]:



Фермент был выделен в гомогенном состоянии из бактерий, которые способны утилизировать таурин в качестве единственного источника углерода и азота [301]. Это пока единственный из известных тиаминовых ферментов, осуществляющий расщепление не —С—С-связи. Он характеризуется высокой степенью специфичности и действует только на сульфоацетальдегид — продукт дезаминирования таурина тауриндегидрогеназой [302].

На этом можно, по-видимому, закончить перечень отдельных представителей тиаминовых ферментов и краткую характеристику реакций, которые они катализируют, и перейти к рассмотрению их свойств.

## Глава вторая

# МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ТИАМИНОВЫХ ФЕРМЕНТОВ

Как уже указывалось во введении, общим для тиаминовых ферментов является то, что при их действии происходит расщепление —С—С-связи. Часть молекулы субстрата отщепляется в свободном виде, а другая часть какое-то время находится в связанном с ферментом состоянии, образуя так называемую активную форму альдегида. В течение долгого времени представление об образовании таких активных промежуточных форм оставалось чисто умозрительным, хотя еще Нейберг [371, 373] указывал на возможность образования «активного ацетальдегида» в качестве промежуточного продукта простого декарбоксилирования пировиноградной кислоты. Подобные взгляды высказывались и для окислительного декарбоксилирования пирувата. По аналогии с этими реакциями предполагалось, что при каталитическом действии транскетолазы в качестве промежуточного продукта образуется «активный гликольальдегид» [246, 396].

Предположения об активных формах ацетальдегида и гликольальдегида основывались на том, что в свободном виде соответствующие альдегиды не обнаруживались ни при действии транскетолазы, ни в процессе окислительного декарбоксилирования пирувата, хотя, если исходить из характера реакций, они должны были бы образовываться в качестве промежуточных продуктов. Кроме того, свободные ацетальдегид и гликольальдегид или вообще не вовлекались в указанные реакции, или их превращение осуществлялось значительно медленнее по сравнению с исходными субстратами. Одно из первых подтверждений возможности существования «активного гликольальдегида» было получено в опытах по изучению



изотопного обмена между радиоактивным гликольальдегидом и нерадиоактивным фруктозо-6-фосфатом, поставленных в присутствии транскетолазы пекарских дрожжей [133, 135]. Опыты ставили следующим образом. Нерадиоактивный фруктозо-6-фосфат инкубировали с  $^{14}\text{C}$ -2-гликольальдегидом в присутствии транскетолазы. Затем смесь пропускали через ионообменную колонку для разделения углеводных компонентов, после чего измеряли их общую и удельную радиоактивность. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, в процессе инкубации образуется меченый фруктозо-6-фосфат с довольно высокой удельной радиоактивностью.

Таблица 1  
Обмен радиоактивности между  $^{14}\text{C}$ -2-гликольальдегидом  
и фруктозо-6-фосфатом [135]

| Вещество                         | мкМ  | Радиоактив-<br>ность,<br>имп/мин | Удельная<br>радиоак-<br>тивность |
|----------------------------------|------|----------------------------------|----------------------------------|
| Гликольальдегид (до инкубации)   | 11,0 | 14 000                           | 1270                             |
| Фруктозо-6-фосфат (до инкубации) | 10,5 | 0                                | 0                                |
| Элюированные с колонки           |      |                                  |                                  |
| фруктозо-6-фосфат                | 5,4  | 2 500                            | 463                              |
| гликольальдегид                  | 4,8  | 10 040*                          | —                                |
| эритрулоза                       | 4,46 |                                  |                                  |

\* Величина представляет собой суммарную радиоактивность гликольальдегида и эритрулозы, так как эти компоненты в данных опытах не разделяли.

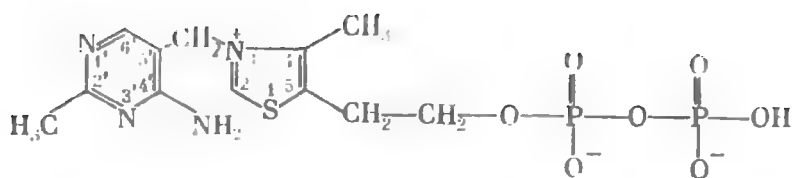
Анализ показал, что вся его радиоактивность сосредоточена в первом углеродном атоме; этого следовало ожидать, исходя из предположения о наличии обменной реакции между «активным гликольальдегидом», образующимся из фруктозо-6-фосфата, и свободным гликольальдегидом, меченным во втором положении. Аналогичные результаты, подтверждающие наличие обменной реакции между «активным гликольальдегидом» и свободным гликольальдегидом, были получены в опытах с использованием нерадиоактивного гликольальдегида и меченого по углероду фруктозо-6-фосфата.

«Активный гликольальдегид» удалось выделить из инкубационной смеси, в состав которой входили соответст-

вующий субстрат и транскетолаза [133, 135, 231, 237]. Для этого применяли различные методы, такие, например, как осаждение этанолом, адсорбция на кальций-фосфатном геле, хроматография на колонке с фосфоцеллюлозой. При использовании в качестве субстрата транскетолазы фруктозо-6-фосфата эффективное разделение достигалось на смоле Дауэкс-1. Пропуская через такую колонку смесь после инкубации, собирали в растворе фермент, в то время как субстрат реакции (фруктозо-6-фосфат) оставался связанным со смолой. При использовании меченного по углероду фруктозо-6-фосфата часть радиоактивности обнаруживалась в растворе фермента. После депротенинизации и последующего хроматографирования на бумаге радиоактивность распределялась следующим образом: в том районе, где должен находиться гликольальдегид — 68% радиоактивности; 4% находилось в пятне, которое соответствовало эритролозе, и 28% относили за счет фруктозо-6-фосфата. Если к части радиоактивного фермента, полученного с колонки, добавить не радиоактивный гликольальдегид, то указанное распределение мягки менялось. Ее содержание в гликольальдегиде уменьшалось, а в эритролозе — увеличивалось. Радиоактивность фруктозо-6-фосфата оставалась практически неизменной. Эти опыты наглядно демонстрируют образование гликольальдегид-ферментного комплекса и возможность его взаимодействия с одним из обычных акцепторов (свободным гликолевым альдегидом) с образованием типичного продукта транскетолазной реакции (эритролозы).

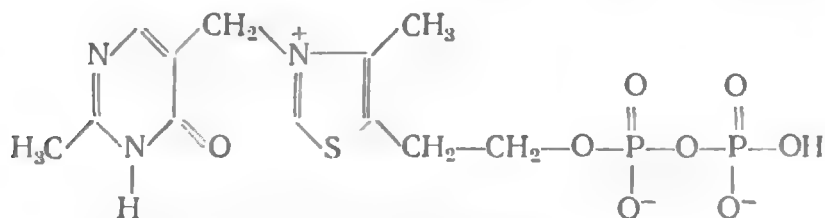
Аналогичные результаты были получены при использовании рибозо-5-фосфата в качестве акцептора гликольальдегида. Правда, в этом случае из-за недостатка материала не удалось точно идентифицировать продукт реакции — седогептулозо-7-фосфат.

Постулирование и экспериментальное подтверждение факта образования промежуточных «активных комплексов» в реакциях, катализируемых тиаминовыми ферментами, еще ничего не говорило о химизме самих реакций. Оставалось также неясным, каким образом происходит прикрепление альдегида к коферменту, какая из группировок или частей сложной молекулы тиаминпирофосфата (I) непосредственно участвует в образовании этих «активных комплексов».

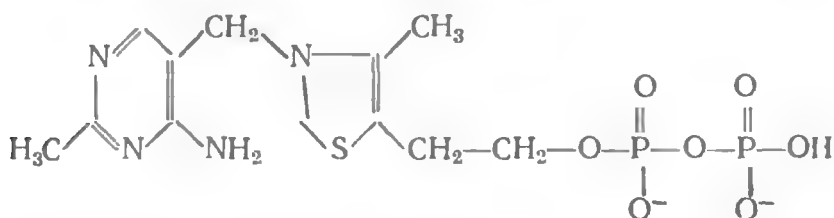


Тиаминпирофосфат (I)

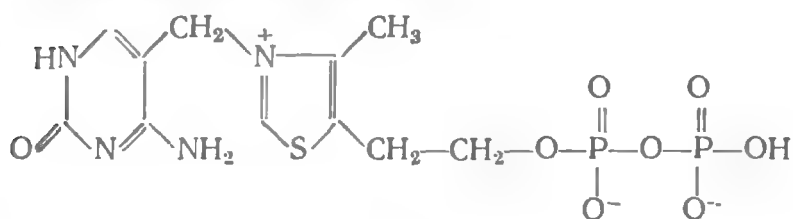
Едва ли не все возможные группы тиаминпирофосфата предполагались в качестве активных — и аминогруппа, расположенная в четвертом положении пиримидинового кольца, реагирующая, как полагали, с пируватом с образованием шиффова основания [551], и четвертичный азот тиазоловой половины с участием окислительно-восстановительного механизма [330, 406], и сульфгидрильная форма кофермента, образующаяся при раскрытии тиазолового кольца, и даже метиленовый мостик, соединяющий две гетероциклические системы [161, 261]. Ни одна из этих гипотез не получила экспериментального подтверждения ни на модельных системах, ни в опытах с ферментами.



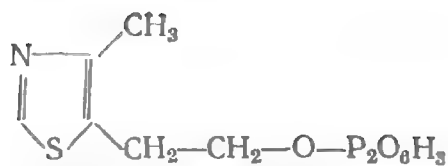
4'-Окси-4'-дезаминотиаминпирофосфат (II)



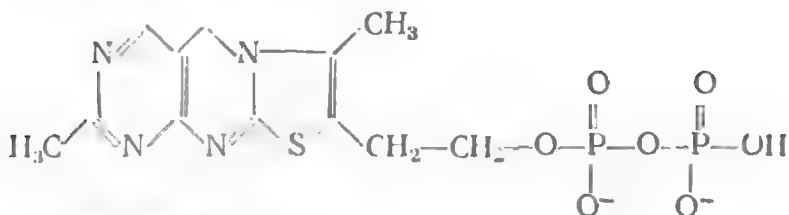
Тетрагидротиаминпирофосфат (III)



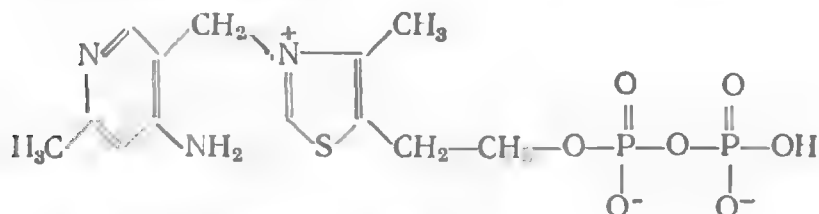
2'-Окситиаминпирофосфат (IV)



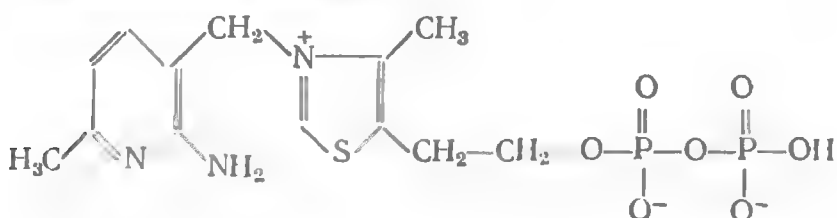
Тиазолпирофосфат (V)



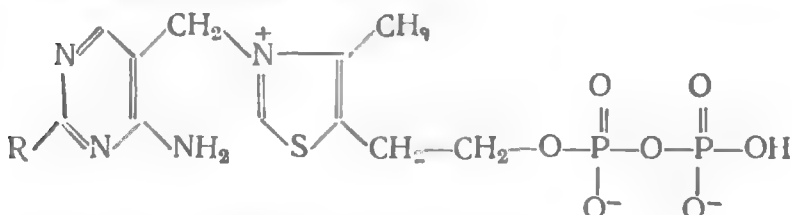
Тиохромпирофосфат (VI)



N-1-Пиридиновый аналог (VII)



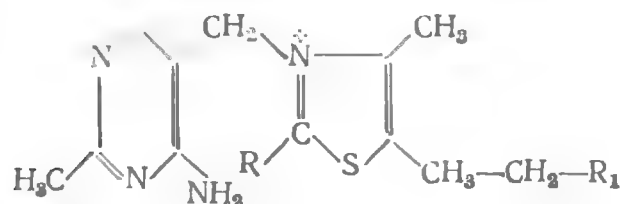
N-3-Пиридиновый аналог (VIII)



2'-Этилтиаминпирофосфат: R=—C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (IX)

2'-н-Бутилтиаминпирофосфат: R=—C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (X)

2'-Метокситиаминпирофосфат: R=—OCH<sub>3</sub> (XI)



Тиамин: R=—H; R<sub>1</sub>=—OH

(XII)

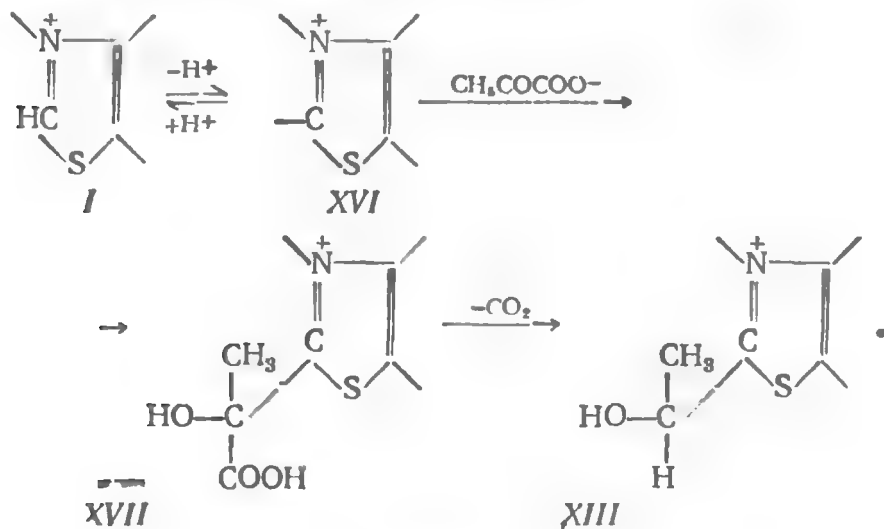
Оксиэтилтиамин:  $R = -CHONCH_3$ ;  $R_1 = -OH$  (XIII)

Оксиэтилтиаминпирофосфат:  $R = -CHONCH_3$ ;  
 $R_1 = -O-P_2O_6H_3$  (XIV)

Диоксиэтилтиаминпирофосфат:  $R = -CHONCH_2OH$   
 $R_1 = -O-P_2O_6H_3$  (XV)

Важная роль в расшифровке механизма действия тиаминовых ферментов принадлежит работам японских авторов, которые показали в условиях модельной системы, что тиамин (XII) и многие производные тиазола способны катализировать образование бензоина из двух молекул бензальдегида. В тех же условиях происходило декарбоксилирование пирувата и образование ацетонина [359].

Решение проблемы тиаминового катализа резко продвинулось вперед после того, как Бреслоу и сотр. [103—106] обнаружили, что водород во втором положении тиазольного кольца тиамина достаточно лабилен и в физиологических условиях способен обмениваться с дейтерием, находящимся в растворе. Отсюда следовало предположение, что при диссоциации этого водорода может образоваться анион и получившийся при этом цвиттернион является активной формой тиамина, которая и реагирует с карбонильной частью различных субстратов. В случае, например, пировиноградной кислоты это мыслилось так, как показано ниже:



Все последующие исследования, проведенные на модельных системах, подтвердили выдвинутую точку зрения. Так, в опытах с различными аналогами тиаминна было показано, что пиримидиновое кольцо не является необходимым для каталитического действия, хотя и повышает реакционность тиазолового кольца [560]. Введение метильной группы во второе положение тиазолового кольца лишает тиамин его каталитических свойств в модельных системах [105] и витаминных свойств — в биологических системах [89].

В опытах с тиаминном и пируватом ацетонин образовывалось больше в том случае, если в систему добавляли ацетальдегид. Количество декарбоксилированного пирувата при этом изменялось незначительно. В отсутствие ацетальдегида, кроме ацетонина, образуется еще ацетоллактат [290, 559], причем если  $\text{CO}_2$  начинает выделяться сразу же после добавления тиаминна к пирувату, то ацетоллактат в инкубационной среде обнаруживается с некоторым запозданием [260]. Все эти данные указывали на то, что при декарбоксилировании пирувата сначала образуется промежуточное производное тиаминна («активный ацетальдегид»), которое или взаимодействует со второй молекулой пирувата, давая ацетоллактат, или, при наличии в среде свободного ацетальдегида, переходит в ацетонин.

Активный ацетальдегид, т. е. оксиэтилтиамин (XIII), был синтезирован [311, 313], а также выделен из инкубационной смеси, содержащей тиамин и ацетальдегид [309, 357]. Полученный синтетически оксиэтилтиамин взаимодействовал с добавленным ацетальдегидом, образуя ацетонин [312], и был практически так же эффективен, как и тиамин при выращивании *Lactobacillus fermenti* [311].

При инкубации пирофосфорного производного тиаминна — тиаминпирофосфата — с меченным по углероду ацетальдегидом образовывалось производное тиаминпирофосфата с той же величиной удельной радиоактивности, что и исходный ацетальдегид [316]. После отщепления пирофосфата продукт был идентифицирован, как оксиэтилтиамин. Кроме ацетальдегидного производного тиаминпирофосфата, из инкубационной смеси было изолировано и идентифицировано также и ацетонинпроизводное кофермента [313].

Если оксиэтилтиаминпирофосфат (XIV) является промежуточным продуктом и при ферментативном декарбоксилировании пирувата, то он должен эффективно использоваться в соответствующих системах, заменяя пируват и тиаминпирофосфат. При постановке опытов с пируватдекарбоксилазой, выделенной из зародышей пшеницы, исходили из этого предположения, полагая, что каталитические количества декарбоксилазы должны высвобождать ацетальдегид из оксиэтилтиаминпирофосфата [314]. Оказалось, однако, что в указанных условиях ацетальдегид не образовывался. Постановка эксперимента предполагала высокую скорость соединения оксиэтилтиаминпирофосфата с ферментом и быстрое отщепление тиаминпирофосфата от фермента после высвобождения ацетальдегида. Скорость же отщепления, как показали проверочные опыты, оказалась чрезвычайно низкой [314, 315], что и явилось причиной неудачи опытов в такой постановке. При использовании фермента в относительно больших количествах стало возможно наблюдать образование ацетальдегида, причем его образовывалось тем больше, чем больше добавлялось в пробу пируватдекарбоксилазы. Этого следовало ожидать, учитывая низкую скорость отщепления кофермента.

Оксиэтилтиаминпирофосфат, полученный синтетически, был исследован и в других энзиматических реакциях. Ферментный препарат из *Aerobacter aerogenes* образует ацетонин из пирувата. Тот же самый продукт накапливался и при использовании оксиэтилтиаминпирофосфата вместо тиаминпирофосфата и пирувата [314]. Как и при образовании ацетальдегида под действием декарбоксилазы зародышей пшеницы, ацетонин накапливался в количествах, пропорциональных добавленному ферменту. При добавлении в реакционную среду феррицианида (было известно, что в этих условиях происходит окислительное декарбоксилирование пирувата и образуется уксусная кислота) из оксиэтилтиаминпирофосфата образовывался ацетат, причем без фермента его образовывалось очень мало. Вышеприведенные данные указывали на то, что синтетически полученный оксиэтилтиаминпирофосфат, предполагаемый промежуточный продукт ферментативных превращений пирувата, участвует во всех исследованных реакциях и дает те же

самые продукты превращения, что и исходный субстрат — пировиноградная кислота.

Диоксиэтилтиаминпирофосфат (XV) — производное тиаминпирофосфата, предполагавшееся в качестве промежуточного продукта в транскетолазной реакции, также был получен синтетически и подвергнут ферментативному изучению [234, 313, 314]. В этих опытах использовали апотранскетолазу пекарских дрожжей. Акцентом гликольальдегида служил рибозо-5-фосфат. Гликольальдегидный остаток, входящий в состав диоксиэтилтиаминпирофосфата, был мечен по обоим углеродам. За реакцией следили по образованию седогептулозо-7-фосфата. Оказалось, что седогептулозо-7-фосфат образуется лишь в том случае, если был добавлен фермент. Радиоактивность обнаруживалась только в двух первых углеродных атомах седогептулозо-7-фосфата, причем в одинаковых количествах.

Во всех вышеприведенных экспериментах использовались синтетически полученные производные тиаминпирофосфата — оксиэтилтиаминпирофосфат и диоксиэтилтиаминпирофосфат. Требовалось, однако, доказать образование этих предполагаемых промежуточных соединений в процессе ферментативных реакций и возможность их дальнейших превращений, чтобы с уверенностью говорить о правильности выдвинутой гипотезы относительно химизма участия тиаминпирофосфата в ферментативных реакциях.

Как уже указывалось выше, при инкубации транскетолазы пекарских дрожжей с соответствующим субстратом образовывался «активный гликольальдегид»-ферментативный комплекс. Этот комплекс изолировали и показали, что он характеризуется способностью переносить гликольальдегидный остаток на соответствующий акцептор, типичный для обычной транскетолазной реакции.

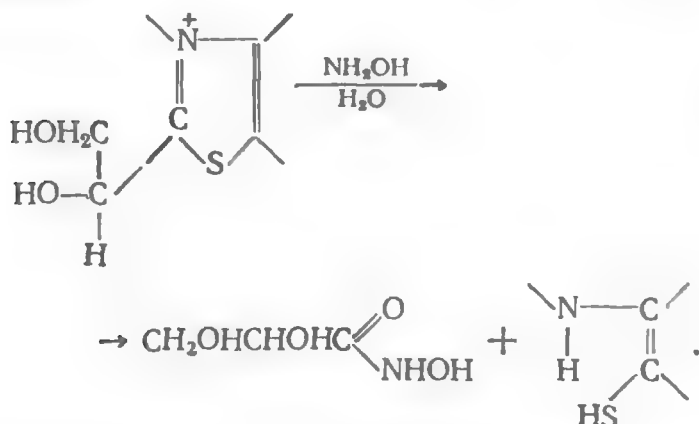
Таким образом, транскетолазная реакция искусственно проводилась в две последовательные стадии. Результаты проведенных экспериментов свидетельствовали в пользу того, что «активный гликольальдегид» является нормальным промежуточным продуктом в транскетолазной реакции.

Для точной идентификации структуры «активного гликольальдегида» требовались достаточно большие его



количества, а в системе транскетолаза+фруктозо-6-фосфат его образуется мало. Поэтому была предпринята попытка найти более подходящий «источник» ферментативного получения «активного гликольальдегида». Таким «источником» оказалась система, состоящая из оксипирувата, тиаминпирофосфата и частично очищенного пируватдегидрогеназного комплекса из сердечной мышцы свиньи [155, 386]. Препараты «активного гликольальдегида», полученные двумя указанными способами, вели себя аналогично при исследовании методами бумажной хроматографии и электрофореза, а при их инкубации с рибозо-5-фосфатом (в присутствии дрожжевой транскетолазы) в обоих случаях образовывался седогептулозо-7-фосфат [390]. Использование оксипирувата в качестве источника получения «активного гликольальдегида» позволило иметь последний в таких количествах, что можно было приступить к изучению его структуры. Хольцер и сотр. [94] исходили из предположения, что структура «активного гликольальдегида» должна быть аналогичной структуре «активного ацетальдегида» и представлять собой тиаминпирофосфат, у которого водород во втором положении тиазолового кольца заменен на диоксиэтильную группу. Экспериментально такая структура была подтверждена следующим образом. Меченный по гликолевому остатку «активный гликольальдегид», полученный ферментативно указанным выше способом, дефосфорилировали, обрабатывали сульфитом (который расщепляет тиамин на две половины — пиримидиновую и тиазоловую) и затем исследовали электрофоретически. На электрофореграмме обнаруживались две полосы. Одна была идентична (2-метил-4-амино-5-пиримидил)-метил-сульфонату — обычному продукту расщепления тиамина сульфитом. Вторая соответствовала тиазоловой части; в ней и была сосредоточена вся радиоактивность. Эту фракцию элюировали и затем хроматографировали. При этом на хроматограмме обнаруживали два пятна. Одно из них соответствовало свободному тиазоловому остатку и не содержало радиоактивности. Вся она была во втором пятне, которое соответствовало тиазоловому остатку, связанному с диоксиэтильной группой. Специфическая реакция была использована для точной идентификации места прикрепления диоксиэтильной группы

к тиаминпирофосфату. Тиазоловая половина „активного гликольальдегида“ имеет структуру тиимида глицириновой кислоты. Отсюда следовало, что если  $^{14}\text{C}$ -диоксиэтильная группа присоединена ко второму углеродному атому тиазолового кольца, то при обработке  $^{14}\text{C}$ -диоксиэтилтиаминпирофосфата гидроксиламином должна образовываться радиоактивная глицерил-гидроксамовая кислота:



Так и оказалось в действительности. Эти данные указывали на то, что  $^{14}\text{C}$ -1,2-диоксиэтильная группа присоединена во втором положении тиазолового кольца тиаминпирофосфата и, следовательно, «активный гликольальдегид», как и предполагалось, является 3-(2-метил-4-амино-5-пиримидил) - метил-2-(1,2-диоксиэтил)-4-метил-5-(пирофосфорил-2-оксиэтил)-тиазолом.

Оксиэтилтиаминпирофосфат был изолирован из инкубационной среды, содержавшей пируват и один из следующих ферментов: пируватдекарбоксилазу зародышей пшеницы, пируватдегидрогеназный комплекс или пируватдекарбоксилазу из пивных дрожжей [115, 116, 229, 230, 232, 460]. Было также показано, что изолированный оксиэтилтиаминпирофосфат участвует во всех энзиматических реакциях, субстратом которых является пируват [171, 172, 229, 232, 235, 238, 508].

В процессе образования «активного ацетальдегида» в инкубационной среде накапливаются и другие производные тиаминпирофосфата. Так, из 1- $^{14}\text{C}$ -пирувата в присутствии пируватдекарбоксилазы образовывалось меченое производное тиаминпирофосфата, которое затем декарбоксилировалось с выделением меченого  $\text{CO}_2$  [229, 230, 232]. Если же в качестве субстрата исполь-

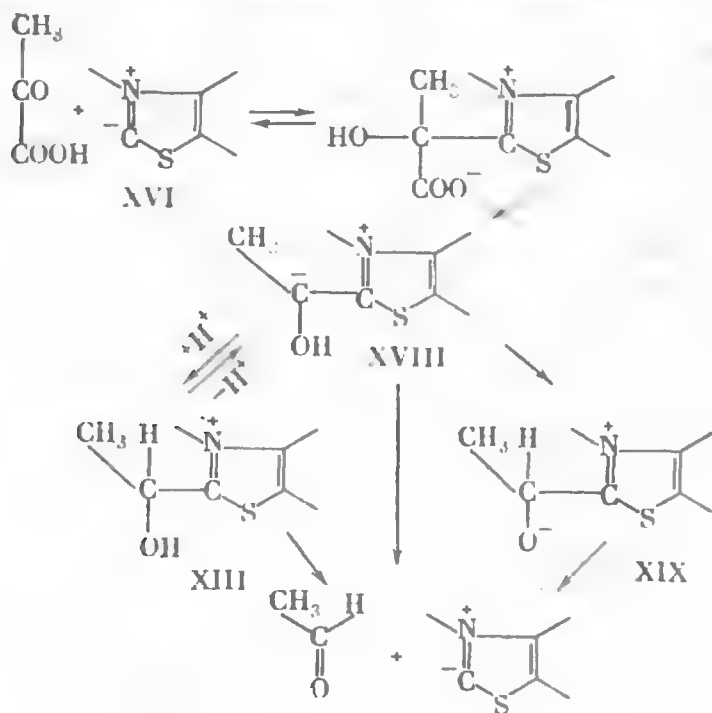
зовали 2-<sup>14</sup>C-пируват, то меченым оказывался ацетальдегид. Кроме того, указанное производное кофермента могло превращаться в оксиэтилтиаминпирофосфат как под влиянием пируватдекарбоксилазы, так и спонтанно. Аналогичные результаты были получены при замене пируватдекарбоксилазы пируватдегидрогеназным комплексом. На основании этих данных авторы высказывают предположение, что вещество, образующееся, наряду с оксиэтилтиаминпирофосфатом, из пирувата и тиаминпирофосфата при наличии соответствующего фермента, является «активным пируватом», т. е. пируватом, соединенным с тиаминпирофосфатом, и участвует в реакции в качестве предшественника оксиэтилтиаминпирофосфата. Накопление промежуточного кофермент-субстратного комплекса наблюдалось и в реакциях, катализируемых транскетолазой [135]. Образование «активного кофермент-субстратного комплекса», по-видимому, характерно для всех тиаминовых ферментов.

На основании изложенного материала представляется возможным изобразить следующую последовательность отдельных этапов в реакциях, катализируемых тиаминпирофосфатом. На первой стадии субстрат взаимодействует с коферментом, присоединяясь ко второму углеродному атому тиазолового кольца; образуется так называемый «активный субстрат». Затем происходит разрыв —C—C-связи субстрата и образование соответствующего «активного альдегида». Характер же дальнейших превращений будет зависеть от условий и специфики фермента, катализирующего данную реакцию. «Активный гликольальдегид» переносится на соответствующий акцептор альдегида, а «активный ацетальдегид» (или какой-либо другой, в зависимости от того, какая  $\alpha$ -кетокислота вступила в реакцию) будет или освобождаться в свободном виде, или окисляться и претерпевать дальнейшие превращения, или участвовать в ацилоиновой конденсации.

Таким образом, в качестве первичного продукта декарбоксилирования предполагался «активный альдегид», например, оксиэтилтиаминпирофосфат (XIV), если субстратом реакции служила пировиноградная кислота. Действительно, как уже говорилось выше, оксиэтилтиаминпирофосфат, полученный синтетически и ферментативно, подвергался тем же энзиматическим превраще-

ниям, что и пируват. И хотя скорость его превращения была на несколько порядков ниже, чем пирувата, однако это объясняли медленным замещением кофермента, связанного с апоферментом оксиэтилтиаминпирофосфатом [31, 171, 173, 228, 313]. Экспериментальные данные как будто подтверждали такое объяснение. Впоследствии, однако, оказалось, что это не совсем так. Действительно, как отщепление тиаминпирофосфата, так и взаимодействие оксиэтилтиаминпирофосфата с апоферментом осуществляется медленно, однако даже при использовании субстратных количеств апопируватдекарбоксилазы в условиях ее полного насыщения оксиэтилтиаминпирофосфатом скорость образования ацетальдегида оказывалась на несколько порядков ниже по сравнению с опытами, где использовали исходный субстрат реакции — пировиноградную кислоту [173, 513].

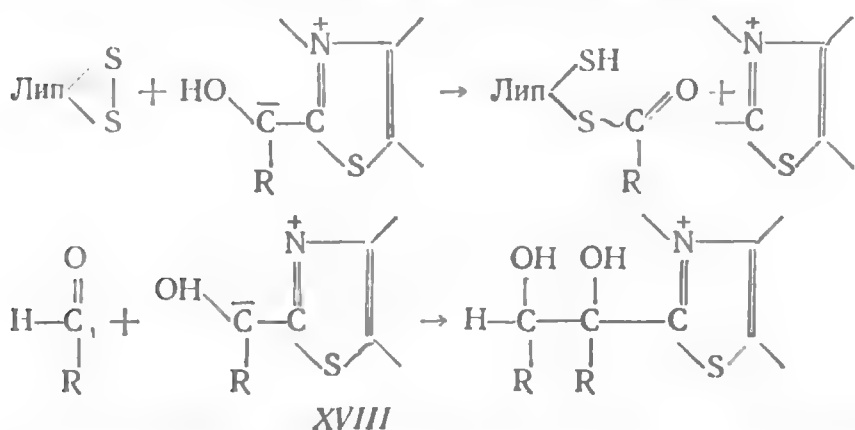
Было высказано предположение, что лимитирующей стадией при энзиматическом превращении оксиэтилтиаминпирофосфата является отщепление от него протона с образованием  $\alpha$ -карбаниона (XVIII). В пользу



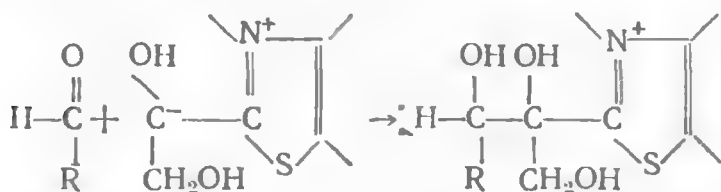
этого свидетельствовали и данные, полученные методом ЯМР [355, 514]. Сущность их заключается в том, что переход протонированной формы оксиэтилтиаминпиро-

фосфата в  $\alpha$ -карбанион при рН ниже 8 протекает с очень низкой скоростью. В то же время оптимум рН пируватдекарбоксилазы, с которой проводили исследования, лежит в области 6—7.

Поэтому стали считать [352, 508, 509, 515], что первичным продуктом реакции декарбоксилирования пирувата (и других  $\alpha$ -кетокислот) является  $\alpha$ -карбанион, который должен легко вступать во взаимодействие с остатком липоевой кислоты в реакциях, катализируемых дегидрогеназными комплексами  $\alpha$ -кетокислот, и с молекулой альдегида при ацилоиновой конденсации.

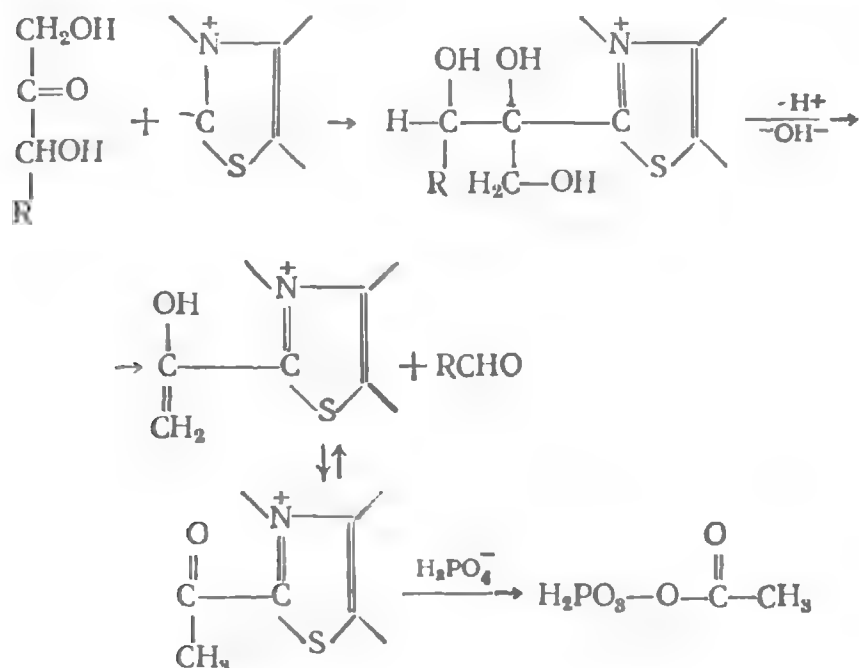


Предполагают, что по этому же типу осуществляется катализ и транскетолазой.



Несколько сложнее обстоит дело с фосфокетолазой, расщепляющей ксилулозо-5-фосфат (фруктозо-6-фосфат) до ацетилфосфата и глицеральдегид-3-фосфата (эритрозо-4-фосфата). Реакции, катализируемые данным ферментом, необратимы, и в его присутствии не происходит обмена ни между ацетилфосфатом и радиоактивным фосфатом, ни между ксилулозо-5-фосфатом и триозофосфатом (вне зависимости от того, имеется ли в среде фосфат или он отсутствует) [209]. Это как будто бы исключает возможность образования «активного гликольальдегида» в качестве промежуточного продукта

в фосфокетолазной реакции. Был предложен следующий механизм действия данного фермента [241].

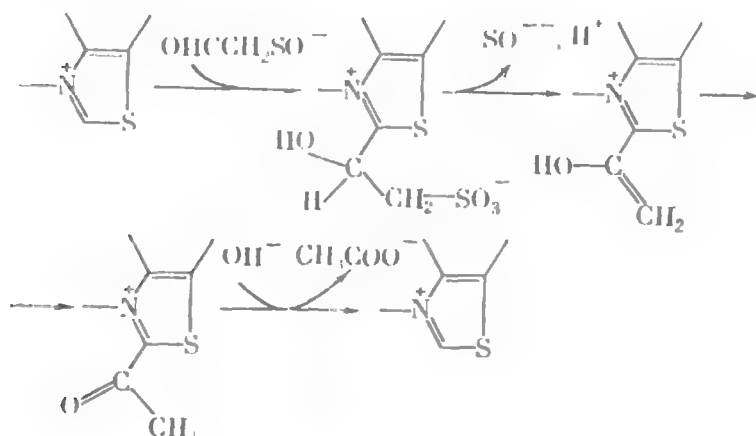


Согласно этому механизму, сначала, как и в случае других тиаминовых ферментов, карбонильная группа субстрата взаимодействует со вторым углеродным атомом тиазолового кольца тиаминпирофосфата. Затем одновременно происходит разрыв —С—С-связи субстрата и отщепление молекулы воды (возможно, молекула воды от субстрата отщепляется в момент его взаимодействия с коферментом). В результате последующей кетонизации образуется очень лабильное ацетильное производное тиаминпирофосфата, легко взаимодействующее с фосфатом.

Нельзя, однако, не учитывать того, что в присутствии фосфокетолазы и фосфата диоксиэтилтиаминпирофосфат превращается в ацетилфосфат [452, 533]. Более того, диоксиэтилтиаминпирофосфат обнаруживается при действии фосфокетолазы на ксилулозо-5-фосфат. Реакция эта оказалась обратимой, и в присутствии субстратных количеств фермента наблюдался обмен двууглеродным фрагментом между диоксиэтилтиаминпирофосфатом и ксилулозо-5-фосфатом [532]. Эти данные указывают на возможность образования общего промежуточного про-

дукта на ранних стадиях реакций, катализируемых транскетолазой и фосфокетолазой.

Механизм участия тиаминпирофосфата в реакции, катализируемой сульфоацетальдегид:сульфолиазой, не исследовался, но предположительно последовательность отдельных стадий может быть написана следующим образом [301]:



В модельных опытах было показано, что различные соли тиазолья способны декарбоксилировать  $\alpha$ -кетокислоты, образуя «активный альдегид» или осуществляя ацилоновую конденсацию. Освобождения свободного альдегида, однако, не происходило. Последнее можно было наблюдать при добавлении в систему органических оснований, таких как имидазол, 2-аминопиримидин и др. Это наводило на мысль, что одна из функций пиримидиновой половины тиаминпирофосфата в ферментативных реакциях может заключаться в освобождении альдегида из связанной с коферментом формы. Данный вопрос детально исследовали в лаборатории Шелленбергера [436, 443, 444, 447, 448].

Оказалось, что любая модификация 4'-аминогруппы тиаминпирофосфата, так же как и замена ее на водород, дает аналоги, полностью лишенные коферментной функции. Отсутствие ферментативной активности могло указывать на то, что аналоги лишены способности взаимодействовать с апоэнзимом. Действительно, это имело место, например, при метилировании 4'-аминогруппы [447]. Однако другой аналог — окситиаминпирофосфат (II) взаимодействовал с пироватдекарбоксилазой в

такой же степени, как и кофермент, но образования ацетальдегида из пирувата не происходило и в данном случае. Определенную ясность в этот вопрос внесли опыты с использованием в качестве субстрата меченного по углероду пирувата. Если использовали 1-<sup>14</sup>C-пируват, то при инкубации с пируватдекарбоксилазой, с которой вместо тиаминпирофосфата был связан окситиаминпирофосфат, наблюдалось образование меченого CO<sub>2</sub>. При использовании 2-<sup>14</sup>C-пирувата метка обнаруживалась в производном окситиаминпирофосфата, у которого со вторым углеродным атомом тиазолового кольца связан оксиэтильный остаток. В обоих случаях в инкубационной среде было показано наличие продукта конденсации пирувата со вторым углеродным атомом тиазолового кольца. Свободный ацетальдегид ни в том, ни в другом случае не образовывался. Таким образом, при замене —NH<sub>2</sub>-группы тиаминпирофосфата на —ОН-группу начальные стадии ферментативной реакции декарбоксилирования пирувата осуществляются так же, как и в опытах с нативным холоферментом: происходит взаимодействие субстрата со вторым углеродным атомом тиаминпирофосфата и отщепление CO<sub>2</sub>. Нарушенной оказывается лишь последующая стадия — образование свободного ацетальдегида. Отсюда следовало, что аминогруппа кофермента необходима для нормального протекания реакции декарбоксилирования пирувата, участвуя в освобождении образовавшегося ацетальдегида<sup>1</sup>.

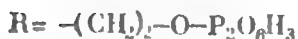
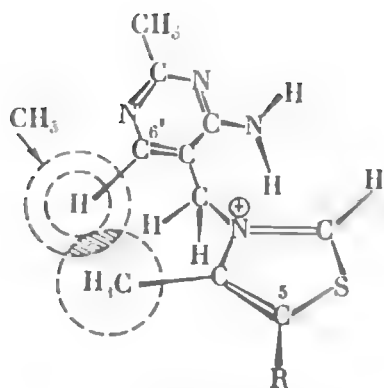
Хотя в окситиаминпирофосфате не только отсутствует аминогруппа, но изменен и рядом стоящий азот пиримидинового кольца, последнее не является причиной нарушения функции окситиаминпирофосфата. Аналог тиаминпирофосфата, у которого данный азот вообще отсутствует, сохраняет коферментные функции.

Согласно представлениям Шелленбергера, для выполнения каталитической функции пространственное расположение реакционных центров кофермента (второго углеродного атома и аминогруппы) должно быть таким, как показано ниже.

---

<sup>1</sup> Соображения о двухэтапном механизме действия тиаминпирофосфата высказывали и раньше [35].





Это как будто подтверждается в эксперименте. Действительно, аналог тиаминпирофосфата, у которого 6'-Н-атом заменен на метильную группу, лишен коферментной активности [433]. В то же время удаление 4-CH<sub>3</sub>-группы при одновременном введении метильной группы в шестое положение пиримидинового кольца тиаминпирофосфата не сказывается на коферментной активности. Шелленбергер это объясняет таким образом, что в первом случае происходит изменение пространственной ориентации реакционных центров, а во втором — ориентация не нарушается. Рентгеноструктурный анализ тиамин показал [385], что расположение реакционных центров друг относительно друга не соответствует тому, которое изображено выше. Поэтому соответствующая конформация кофермента, необходимая для осуществления им каталитической функции, должна, по-видимому, создаваться апоферментом в процессе образования холофермента [45, 433, 436].

Продукт пируватдекарбоксилазной реакции — ацетальдегид тормозит действие пируватдекарбоксилазы [118, 266]. Использование титрометрического метода определения пируватдекарбоксилазной активности с применением в качестве титрующего агента пировиноградной кислоты [440] позволило получить новые данные и объяснить специфику ингибирующего действия альдегида [253]. Результаты, о которых будет идти речь ниже, интересны еще и тем, что они хорошо укладываются в представление о двуцентровом механизме действия пируватдекарбоксилазы.

Хюбнер и Шелленбергер [253] показали, что ингибирование пируватдекарбоксилазы ацетальдегидом в области насыщающих концентраций субстрата неконкурентное и не зависит от концентрации пирувата. При низких концентрациях ингибирование становится зависимым, причем с уменьшением концентрации субстрата степень ингибирования также снижается. Полученные экспериментальные данные авторы объясняют взаимодействием ацетальдегида с тем реакционным центром пируватдекарбоксилазы, который осуществляет отщепление продукта реакции от холофермента. При насыщающей концентрации субстрата эта стадия пируватдекарбоксилазной реакции, следующая за необратимым отщеплением  $\text{CO}_2$ , является лимитирующей. Поэтому в данных условиях ингибирование ацетальдегидом не зависит от концентрации пирувата.

При очень низких концентрациях субстрата общая скорость декарбоксилирования пирувата определяется стадией, предшествующей отщеплению продукта реакции (такой стадией может быть взаимодействие субстрата с коферментом или последующее отщепление  $\text{CO}_2$ ). Поэтому ингибирование ацетальдегидом становится зависимым от концентрации субстрата: чем она ниже, тем в меньшей степени выражено ингибирование.

Результаты, полученные с использованием меченого ацетальдегида, и кинетические данные [253] подтверждают изложенные представления о механизме ингибирования пируватдекарбоксилазы ацетальдегидом.

Как уже указывалось выше, начальные этапы простого и окислительного декарбоксилирования пирувиноградной кислоты, катализируемые, соответственно, пируватдекарбоксилазой и пируватдегидрогеназным комплексом, осуществляются по одному и тому же механизму. В результате выделяется  $\text{CO}_2$  и образуется остаток уксусного альдегида, связанный со вторым углеродным атомом тиазолового кольца тиаминпирофосфата. Затем в первом случае происходит освобождение ацетальдегида в среду, а во втором — его окисление с образованием ацетильного производного липоевой кислоты, ковалентно связанной с липоилтрансацилазным компонентом пируватдегидрогеназного комплекса.

Согласно двуцентровому механизму, предложенному Шелленбергером и сотр. для пируватдекарбоксилазы,

который мы только что рассматривали, освобождение продукта реакции происходит при непосредственном участии аминогруппы тиаминпирофосфата, выполняющей роль промежуточного акцептора остатка ацетальдегида. Роль этой группы в реакции окислительного декарбоксилирования пирувата была недавно исследована в лаборатории С. Е. Северина [53]. В качестве ферментного препарата использовали пируватдегидрогеназный комплекс, выделенный из грудной мышцы голубя, и пируватдекарбоксилазный компонент этого комплекса (с использованием в качестве искусственного окислителя 2,6-дихлорфенолиндифенила), а в качестве аналогов кофермента — моно- и диметилированные по 4'-аминогруппе производные тиаминпирофосфата, а также окситиаминпирофосфат (II).

Оказалось, что ни пируватдегидрогеназный комплекс, ни его пируватдекарбоксилазный компонент не проявляют каталитической активности, если вместо тиаминпирофосфата использовали вышеуказанные аналоги. В то же время, если судить по кинетическим данным, аналоги связываются с белком, причем связывание осуществляется по месту активного центра.

Более того, при использовании соответствующим образом меченного по углероду пирувата не удалось показать наличия и первого акта реакции превращения субстрата, т. е. отщепления  $\text{CO}_2$  и образования оксипропионного производного окситиаминпирофосфата, как это было ранее показано Шелленбергером и сотр. для пируватдекарбоксилазы.

Таким образом, модифицированные по 4'-аминогруппе аналоги тиаминпирофосфата не способны заменить нативный кофермент в реакции окислительного декарбоксилирования пирувата ни на одной из стадий ее протекания.

## Глава третья

### ИНГИБИТОРЫ

Различные ингибиторы давно и успешно используются для изучения ферментов, их структуры, функциональных групп, строения активного центра, механизма действия, специфики взаимодействия с субстратами и коферментами. Особенно много полезной информации было получено при работе с тканевыми экстрактами и с частично очищенными ферментными препаратами, когда другие методы оказались, по существу, не эффективны. Но и сейчас, когда стало возможным выделить ферменты в чистом виде в количествах, достаточных для их изучения другими методами, ингибиторный анализ не утратил своего значения и продолжает широко использоваться в различных лабораториях. Тем более, что препаративный синтез высокоспецифических ингибиторов позволяет осуществлять целенаправленное воздействие на фермент и вмешательство в обменные процессы живой клетки или даже целого организма.

Тиаминовые ферменты в этом смысле изучены еще недостаточно. Одним из наиболее широко изученных ингибиторов тиаминовых ферментов является окситиаминпрофосфат (II). В опытах *in vivo* интенсивно исследовали дефосфорилированную форму этого аналога — окситиамин, которая легко проникает в клетки (исключение составляет ткань мозга [36, 38]) и характеризуется высокой степенью эффективности [36, 38, 62, 185, 186]. Следует, однако, заметить, что действие окситиамина *in vivo* обусловлено его влиянием не только на активность тиаминовых ферментов, но и на целый ряд других обменных реакций — факт, убедительно показанный в лаборатории Ю. М. Островского [40].

## ИНГИБИРОВАНИЕ ТИАМИНОВЫХ ФЕРМЕНТОВ ОКСИТИАМИНПИРОФОСФАТОМ

Результаты экспериментов, поставленных с высокоочищенным препаратом пируватдекарбоксилазы, выделенным из зародышей пшеницы, приведены на рис. 1. Концентрация кофермента и окситиаминпирофосфата во всех случаях была соответственно  $7,8 \cdot 10^{-9}$  М и  $3,88 \cdot 10^{-7}$  М. Фермент был практически полностью разоблен от тиаминпирофосфата и в его отсутствие показывал лишь незначительную ферментативную активность. После добавления кофермента активность восстанавливалась, причем вначале скорость реакции была значительно снижена, потом она увеличивалась и со временем достигала постоянной величины (кривая 1). Это, по-видимому, можно объяснить медленной скоростью взаимодействия апофермента с коферментом, так как в случае предварительной инкубации апопируватдекарбоксилазы с тиаминпирофосфатом постоянная скорость реакции наблюдается в более ранние сроки (кривая 2). Последующее добавление в эту пробу окситиаминпирофосфата не влияет на величину ферментативной активности (кривая 3), показывая тем самым отсутствие ингибирования холофермента и достаточно прочное связывание кофермента с апопируватдекарбоксилазой. Одновременное добавление к энзиму тиаминпирофосфата и окситиаминпирофосфата уже существенно влияет на его активность (кривая 4), и оно еще более усиливается, когда сначала добавляется ингибитор, а затем кофермент (кривая 5). Если в последнем случае концентрацию тиаминпирофосфата повысить примерно в 25 раз (в таком случае она становится сопоставимой с концентрацией окситиаминпирофосфата), то определяемая активность станет выше (кривая 6). Таким образом, кофермент достаточно легко вытесняет ингибитор из его связи с белком.

Похожая картина наблюдалась и при исследовании пируватдекарбоксилазы, изолированной из пивных дрожжей [152].

Очень чувствительна к действию окситиаминпирофосфата транскетолаза пекарских дрожжей [134]. Уже при концентрации ингибитора, равной  $3,6 \cdot 10^{-8}$  М, 60% апофермента оказывалось заблокированным. Повышение

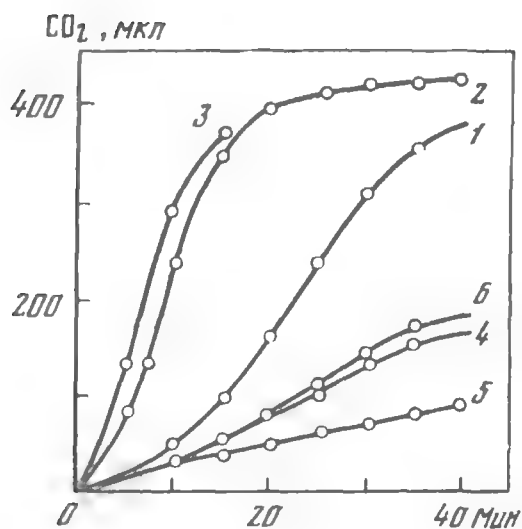


Рис. 1. Влияние окситиаминпирофосфата на активность пируватдекарбоксилазы зародышей пшеницы [149]

1 — тиаминпирофосфат (без предварительной инкубации); 2 — тиаминпирофосфат (предварительно инкубировали с пируватдекарбоксилазой); 3 — как 2, только добавлен окситиаминпирофосфат; 4 — тиаминпирофосфат и окситиаминпирофосфат добавлены к пируватдекарбоксилазе одновременно; 5 — сначала добавлен окситиаминпирофосфат, а затем — тиаминпирофосфат; 6 — как 5, только концентрация тиаминпирофосфата в 25 раз выше

концентрации в два раза сопровождалось увеличением степени ингибирования до 80%. При одновременном добавлении к апотранскетолазе окситиаминпирофосфата и кофермента (в 1000-кратном избытке) снижение ферментативной активности все еще наблюдалось. Приведенные данные указывали на то, что аналог кофермента характеризуется очень высоким сродством к транскетолазе, значительно большим, чем сам кофермент. Это подтвердилось и в дальнейших экспериментах, которые ставили следующим образом [134].

Апотранскетолазу преинкубировали при комнатной температуре с насыщающей концентрацией тиаминпирофосфата. Добавляли насыщенный раствор сульфата аммония. Образовавшийся осадок промывали раствором сульфата аммония 70% степени насыщения, растворяли в буфере и использовали для работы. Полученный таким образом препарат фермента для проявления максимальной активности не требовал добавления кофакторов извне, т. е. он был полностью представлен холоферментом. Активность его практически не изменялась в течение 4 ч. Если к такому холоферменту добавить окситиаминпирофосфат ( $1,2 \cdot 10^{-5}$  М), то наблюдается прогрессивное падение транскетолазной активности и к четвертому часу остается лишь 25% от исходной. Следовательно, ингибитор достаточно легко вытесняет кофермент из холотранскетолазы. Обратный процесс — вытеснение ингибитора из его связи с апоферментом — идет

гораздо медленнее и даже в присутствии 1500-кратного (по отношению к окситиаминпирофосфату) избытка кофермента активность за 3 ч восстанавливается лишь на 20%.

Все тиаминовые ферменты катализируют расщепление —С—С-связи субстрата (за одним исключением, о котором шла речь в главе I) и требуют для своего действия один и тот же кофермент — тиаминпирофосфат. Это предполагает много общего в их свойствах, особенно в механизме ферментативного катализа, во всяком случае — на начальных его этапах. С другой стороны, они действуют на разные субстраты, осуществляя в конечном счете различные их превращения — простое декарбоксилирование, окислительное декарбоксилирование, трансферазные реакции — и поэтому должны иметь индивидуальные различия, специфику, характерную для того или иного фермента. Это положение хорошо иллюстрируется на примере их ингибирования аналогом кофермента — окситиаминпирофосфатом.

Действительно, как указывалось выше, и пируватдекарбоксилаза и транскетолаза, катализирующие, соответственно, простое декарбоксилирование пирувата и перенос двууглеродного фрагмента с кетосахаров на альдосахара, чувствительны к ингибирующему действию окситиаминпирофосфата. Однако с количественной точки зрения наблюдаются существенные различия. Это выражается в том, что с апотранскетолазой ингибитор связывается намного легче, чем с апопируватдекарбоксилазой, и труднее вытесняется коферментом. Более того, для пируватдекарбоксилазы взаимодействие кофермента с апоферментом осуществляется в несколько раз быстрее, если последний был предварительно зангигирован окситиаминпирофосфатом [433]. По-видимому, ингибитор, связавшись в активном центре, таким образом меняет его структуру, что она становится благоприятной для последующего присоединения кофермента (ингибитор при этом, естественно, отщепляется). В то же время вытеснение окситиаминпирофосфата из его связи с апотранскетолазой осуществляется крайне медленно, даже при использовании очень высоких концентраций кофермента [134].

В последующем изложении мы еще не раз коснемся различий и сходства в структуре и функции тиаминовых ферментов,

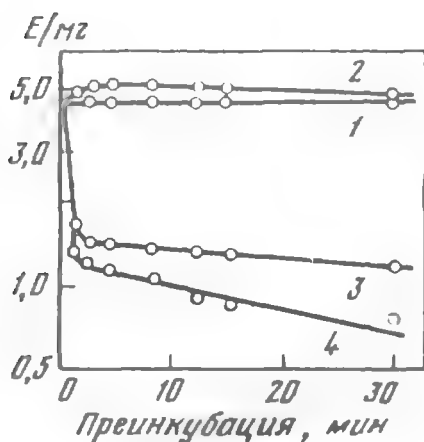


Рис. 2. Влияние бромпирувата на ферментативную активность пируватдекарбоксилазного компонента пируватдегидрогеназного комплекса *E. coli* [338]

1 — без добавок; 2 — тиаминпирофосфат; 3 — тиаминпирофосфат + бромпируват; 4 — бромпируват

**Ингибирование аналогом субстрата.** Ферментативная активность пируватдегидрогеназного комплекса из *E. coli*, измеренная в полной системе по количеству образующегося ацетил-КоА или восстановленного НАД, существенно снижается в присутствии бромпирувата [158, 338]. Почти полное ингибирование осуществляется за 13 мин при концентрации бромпирувата, равной  $1 \cdot 10^{-3}$  М. Необходимое условие при этом — наличие в системе тиаминпирофосфата. Без него падение активности хотя и наблюдается, но со значительно меньшей скоростью. Ингибирование бромпируватом, по-видимому, необратимо, так как пропускание заннгибированного комплекса через сефадекс не сопровождается восстановлением его каталитических свойств.

В тех же условиях индивидуальная активность декарбоксилазного компонента пируватдегидрогеназного комплекса, измеренная в искусственной системе с использованием в качестве переносчика электронов феррицианида, резко снижается уже в самом начале инкубации с ингибитором: через 1 мин остается лишь 25—30% первоначальной активности. Затем скорость инактивации замедляется (рис. 2). В противоположность пируватдегидрогеназному комплексу ингибирование пируватдекарбоксилазы не усиливается при добавлении тиаминпирофосфата и на первом этапе идет с одинаковой скоростью как в его присутствии, так и без него. А на втором, более медленном этапе тиаминпирофосфат даже несколько предохраняет фермент от ингибирования (сравни кривые 3 и 4 на рис. 2).



Одновременное определение индивидуальной активности других компонентов комплекса показало, что активность липоилтрансацилазы не изменяется, а активность липоилдегидрогеназы хотя и снижается, но, во-первых, незначительно, а во-вторых, в одинаковой степени и с одинаковой скоростью независимо от того, добавляли или не добавляли в систему тиаминпирофосфат.

Повышением концентрации ингибитора в присутствии тиаминпирофосфата примерно в 30 раз по сравнению с той, которую использовали в вышеописанных опытах, удалось добиться полной инактивации пируватдегидрогеназного комплекса. Активность индивидуальных ферментов комплекса при этом оставалась все еще высокой [338].

Таким образом, бромпируват неодинаково действует на целый комплекс и на составляющие его компоненты. Различия заключаются в том, что наблюдается разная степень ингибирования: полная — для пируватдегидрогеназного комплекса и частичная — для индивидуальных ферментов; в первом случае процесс стимулируется тиаминпирофосфатом, а во втором — от него независим.

Параллельно с измерением активности исследовали включение метки в пируватдегидрогеназный комплекс, для чего использовали бромпируват, меченный по второму углеродному атому. Полная потеря ферментативной активности сопровождалась включением 50—60 г·атом  $^{14}\text{C}$  на моль комплекса. В отсутствие тиаминпирофосфата, когда ингибирование было лишь частичным, содержание метки в белке было в четыре раза меньше. Вся ли молекула бромпирувата связывается с комплексом или какая-то ее часть (например, остаток альдегида после возможного отщепления  $\text{CO}_2$ ) — остается неизвестным. Неизвестно также, с каким компонентом комплекса взаимодействует ингибитор. Ясно лишь, что связывание ингибитора необратимо, так как метка обнаруживалась в ферментном препарате после его пропускания через сефадекс.

Итак, существенное снижение общей активности пируватдегидрогеназного комплекса происходит только при наличии в системе тиаминпирофосфата. При соответствующих условиях комплекс может быть полностью зангигирован, в то время как активность пируват-

декарбоксилазы остается еще достаточно высокой. Более того, ингибирование пируватдекарбоксилазы практически не зависит от тиаминпирофосфата. Все эти данные указывают на то, что бромпируват взаимодействует с пируватдекарбоксилазным компонентом пируватдегидрогеназного комплекса (не блокируя его активный центр) и претерпевает начальные этапы ферментативного превращения, характерного для окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты. На последующих этапах процесс обрывается. Промежуточный продукт превращения бромпирувата остается необратимо связанным с пируватдегидрогеназным комплексом, что и приводит к потере общей ферментативной активности. По-видимому, это происходит на стадии восстановительного ацетилирования остатка липоевой кислоты, ковалентно связанной с липонилтрансацилазой. Индивидуальная активность данного фермента (в искусственной системе) при этом не изменяется [338], так как в ее проявлении остаток липоевой кислоты не участвует [296].

Об инаktivации пируватдекарбоксилазного компонента пируватдегидрогеназного комплекса, независимой от тиаминпирофосфата, никаких других данных, кроме приведенных выше, в литературе не найдено. Поэтому сказать что-либо определенное об этом процессе в настоящее время не представляется возможным.

Эксперименты с использованием бромпирувата следует считать перспективными. Они могут дать много полезной информации об общем механизме окислительного декарбоксилирования и отдельных стадиях этого процесса, так как указанный ингибитор является аналогом субстрата, действует специфически, связывается необратимо и, очевидно, претерпевает начальные этапы обычного для субстрата ферментативного превращения.

*Другие ингибиторы.* В присутствии  $1 \cdot 10^{-3}$  М цинка активность оксоглутаратдекарбоксилазы из *Mycobacterium phlei* не проявляется [557]. Так же действует и медь на пируватоксидазу из *Proteus vulgaris* [493]. Оба эти катиона полностью ингибируют транскетолазу из пивных дрожжей [377], причем действие ионов меди практически необратимо, в то время как фермент, заингибированный цинком, восстанавливает активность после его пропускания через сефадекс. В меньшей сте-

нии ингибирующее действие вышеуказанных металлов выражено у транскетолазы, изолированной из печени свиньи. При концентрации  $2 \cdot 10^{-2}$  М медь и цинк снижают величину ферментативной активности соответственно на 50 и 8% [476]. Фосфат и сульфат в концентрации  $1 \cdot 10^{-2}$ — $2 \cdot 10^{-2}$  М снижают ферментативную активность кристаллических препаратов транскетолазы пекарских дрожжей на 50% [134]. Примерно такой же эффект получен и с пируватдекарбоксилазой, выделенной из пивных дрожжей [180], и с транскетолазой из зародышей выюна [33]. С другой стороны, активность пируватдекарбоксилазы из мозга быка максимальна только в фосфатном буфере. Со всеми другими буферами она была значительно снижена, а в *трис*-HCl буфере — вообще отсутствовала [48]. Ингибирующее влияние *трис*-HCl буфера отмечалось и в опытах с глиоксиплаткарбоксилазой [82].

Существенное влияние природы буфера на величину каталитической активности (а также на положение оптимума pH ферментативной реакции) наблюдалось и при исследовании декарбоксилазной активности оксoglутаратдегидрогеназного комплекса, выделенного из мозга быка [58].

Эксперименты, проводимые с различными буферами, представляют не только утилитарный интерес, позволяя выбрать оптимальные условия для измерения ферментативной активности, но и дают возможность в ряде случаев получить более полное представление о свойствах энзима. Подробнее мы на этом остановимся, когда будем рассматривать вопросы, связанные с регуляцией действия тиаминовых ферментов.

# Глава четвертая

## СТРУКТУРА ТИАМИНОВЫХ ФЕРМЕНТОВ

### МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС И СУБЪЕДИНИТЕЛЬНАЯ СТРУКТУРА

Молекулярный вес транскетолазы пивнота, определенный методами седиментационного равновесия и гель-фильтрации, равен примерно 100 000 [529]. При электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия обнаруживается одна белковая фракция с той же величиной молекулярного веса. Это указывает на то, что фермент состоит из одной полипептидной цепи.

Мол. вес транскетолазы пекарских дрожжей впервые определен Ченом и Уорнером и приведен в статье Датта и Рекера [135]. Работу проводили на ультрацентрифуге и использовался метод Арчибальда. Была получена величина 140 000. В других работах, где использовали метод седиментационного равновесия, приводятся такие значения мол. веса: 140 000 [219],  $159\,000 \pm 6000$  [2],  $158\,000 \pm 4000$  [119]. В первых случаях исследования проводили с апоферментом, в последнем — с холоферментом.

При электрофорезе в полиакриламидном геле фермента, предварительно обработанного додецилсульфатом натрия, обнаруживалась одна белковая фракция с молекулярным весом 60 000—70 000 [17, 219]. Методом седиментационного равновесия в присутствии 6М гуанидинхлорида и 0,01 М  $\beta$ -меркаптоэтанола получена величина  $75\,000 \pm 2000$  [119].

Аналогичные результаты получены и в том случае, когда фермент помещали в сильно щелочную среду (pH 12). При этом молекулярный вес белковой фракции, определенный методом седиментационного равновесия, равнялся примерно 80 000 [2].

Таким образом, молекула транскетолазы состоит по крайней мере из двух субъединиц. Субъединицы эти,

очевидно, идентичны, что следует из экспериментальных данных, приведенных выше, и, кроме того, подтверждается результатами определения N-концевых аминокислот. В качестве таковых в молекуле транскетолазы обнаружены только остатки аргинина (количественное их определение не проводили) [219].

Заметим, что распад фермента на субъединицы осуществлялся и в отсутствие  $\beta$ -меркаптоэтанола. Это указывает на то, что дисульфидные связи не участвуют в образовании димерной формы фермента.

При исследовании влияния pH на четвертичную структуру транскетолазы отмечено следующее [2]. При pH 12 фермент полностью распадается на субъединицы, в то время как в интервале pH от 5,5 до 11 образования субъединиц практически не наблюдалось (во всяком случае, при концентрации белка в растворе, равной 0,2 мг/мл и выше). Так же влияет pH и на каталитическую активность транскетолазы [26]. В результате выдерживания фермента при pH 5—11 его активность (измеряемая в оптимальных условиях, при pH 7,6) изменяется незначительно. Даже после выдерживания при крайних значениях pH—5 и 11—все еще сохраняется около 85% ее первоначальной величины. При pH 12—изменение всего на единицу по сравнению с pH 11—фермент инактивируется уже примерно на 60%. Это как раз те условия, при которых, как указывалось выше, происходит резкое нарушение четвертичной структуры транскетолазы и она полностью распадается на субъединицы. Отсюда напрашивается предположение о том, что субъединицы транскетолазы более лабильны, чем ее димерная форма, и резкое снижение стабильности фермента при pH выше 11 обусловлено его распадом на субъединицы.

Аналогичную корреляцию со снижением стабильности транскетолазы при pH ниже 5 исследовать не удалось, так как в этих условиях наблюдалась частичная агрегация фермента и поэтому невозможно интерпретировать экспериментальные данные [26].

Распад транскетолазы на субъединицы, который первоначально наблюдали при жестких воздействиях на фермент (в присутствии додецилсульфата натрия, гуанидинхлорида или при высоких значениях pH), осуществляется и в обычных условиях (pH 7,6) при

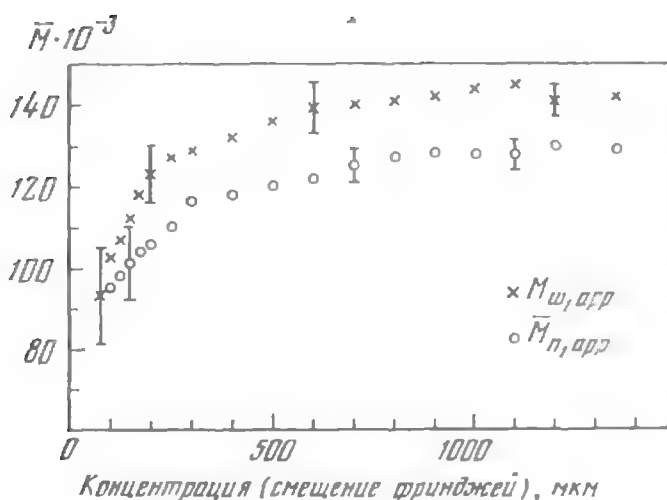


Рис. 3. Зависимость среднечисленного ( $\bar{M}_{n, app}$ ) и средневесового ( $\bar{M}_{w, app}$ ) молекулярного веса транскетолазы от ее концентрации [71]

Нанесены средние величины по всем опытам. Эксперименты ставили при 20° в  $5 \cdot 10^{-2}$  М калий-фосфатном буфере, pH 7,6 при 17980 об/мин и 16200 об/мин в 30 мм двухсекторной и 12 мм шестиканальной ячейках с начальными концентрациями белка 0,09, 1,25, 0,50 и 0,67 мг/мл

понижении исходной концентрации белка в исследуемом растворе (рис. 3). Данные, приведенные на рис. 3, указывают на то, что в данном случае мы имеем дело с обратимо диссоциирующей системой: димер  $\rightleftharpoons 2$  мономер. При наличии в среде кофакторов указанное равновесие смещается влево [119].

Известно, что транскетолаза при pH 7,6 достаточно стабильна [193], но инактивируется при сильном разведении ферментного раствора [126]. Как и при инактивации (pH выше 11), о чем говорилось выше, снижение каталитической активности фермента при разведении также можно объяснить его распадом на субъединицы, которые, по-видимому, более лабильны, чем димерная форма транскетолазы.

Молекула транскетолазы, выделенной из пивных дрожжей, также имеет димерное строение. Мол. вес ее, определенный методом гель-фильтрации, равен  $100\,000 \pm 6000$  [504].

Мол. вес пируватдекарбоксилазы, выделенной из пивных дрожжей, составляет величину 175 000 [512, 516]. По другим данным — 185 000 [384].

В присутствии мочевины (уже при малой ее концентрации) наблюдается быстрая и необратимая инактивация фермента, однако распада на субъединицы не происходит [516]. Только выдерживание в 6М растворе гуанидинхлорида в течение нескольких дней сопровождается появлением компонента с мол. весом 90 000 [512]. Добавление меркаптоэтанола не сказывается на конечном результате, из чего можно заключить, что в образовании функциональной формы фермента дисульфидные связи участия не принимают.

При низких значениях рН пируватдекарбоксилаза пекарских дрожжей находится исключительно в димерной форме с мол. весом около 200 000 [177]. При смещении рН от 7 в щелочную область наблюдается распад на субъединицы одинакового молекулярного веса. В фосфатном буфере равновесие смещено в сторону димерной формы, а *трис*-буфер благоприятствует образованию мономеров. Активна димерная форма фермента. Момеры каталитическими свойствами, по-видимому, не обладают. Процесс диссоциации на субъединицы обратим, и при подкислении раствора димерная форма восстанавливается. Одновременно происходит восстановление исходной ферментативной активности. Субъединицы менее стабильны, чем нативная пируватдекарбоксилаза, и при стоянии способность к реассоциации постепенно пропадает.

Пируватдекарбоксилаза, изолированная из пируватдегидрогеназного комплекса *E. coli*, на седиментограмме при ультрацентрифугировании (рН 7,5) представлена двумя пиками: один из них соответствует мол. весу около 175 000, а другой — примерно 90 000 [142]. Вся ферментативная активность сосредоточена в первом пике. При выдерживании в течение нескольких часов при рН 9,5 количество легкого компонента увеличивается, а количество тяжелого уменьшается, что сопровождается снижением ферментативной активности. Полностью перевести фермент в мономерную форму удалось обработкой 10 М мочевиной в присутствии меркаптоэтанола [142], 1%-ным додецилсульфатом натрия в присутствии меркаптоэтанола или 6М гуанидинхлоридом, также при наличии в среде меркаптоэтанола [531]. Для молекулярного веса пируватдекарбоксилазы из *E. coli*, кроме величины 175 000, которая приведена выше,

были получены также значения 183 000 [154], 190 000 [142, 150] и 200 000—220 000 [531].

Судя по данным ультрацентрифугирования, электрофореза и гель-фильтрации, субъединицы пируватдекарбоксилазы *E. coli*, по-видимому, идентичны. В пользу этого свидетельствует и то, что N-концевой аминокислотой является только серин в количестве двух остатков на молекулу фермента [142, 531]. Обе формы пируватдекарбоксилазы (мономерная и димерная) способны связываться с липоплтрансацетилазой, однако ферментативная активность пируватдегидрогеназного комплекса проявляется лишь в том случае, если в его рекомбинации участвует димерная форма, а не мономер [142].

Кристаллические препараты пируватдекарбоксилазы, изолированные из пируватдегидрогеназных комплексов почек и сердца быка, оказались очень близкими по своим физико-химическим свойствам [84]. При диск-электрофорезе в полиакриламидном геле без детергента они мигрируют одной белковой полосой. В присутствии додецилсульфата натрия обнаруживаются две фракции, одна из которых имеет мол. вес 42 000, а другая — 37 000. Нативная пируватдекарбоксилаза имеет мол. вес 154 000, определенный методом седиментационного равновесия. Отсюда авторы сделали вывод, что фермент состоит из двух типов субъединиц и имеет структуру  $\alpha_2\beta_2$ .

Субъединицы были разделены хроматографически на фосфоцеллюлозе в присутствии 8М мочевины и исследованы. Оказалось, что они различаются по аминокислотному составу и особенно резко различны пептидные карты их триптических гидролизатов.

Предполагается [84, 419], что обе субъединицы ( $\alpha$  и  $\beta$ ) выполняют каталитическую функцию, причем  $\alpha$ -субъединица (мол. вес 42 000) осуществляет первый этап реакции окислительного декарбоксилирования пирувата, т. е. отщепление  $\text{CO}_2$ , а  $\beta$ -субъединица (мол. вес 37 000) — последующее восстановительное ацетилирование остатка липоевой кислоты. Прямых доказательств этому пока не получено, но аргументы, приводимые авторами в пользу такой возможности, выглядят достаточно убедительно. Аргументы эти следующие.

Как уже говорилось, пируватдекарбоксилаза осуществляет два первых этапа окислительного декарбоксили-



рования пирувата — отщепление  $\text{CO}_2$  и последующее восстановительное ацетилирование остатка липоевой кислоты липонилтрансацилазы. Фосфорилирование пируватдекарбоксилазы полностью ингибирует ее каталитическую активность, причем фосфорилируется только  $\alpha$ -субъединица [84] (подробнее на этом мы остановимся позднее). Оказалось, что при этом нарушается только первый этап реакции — отщепление  $\text{CO}_2$  от пирувата, в то время как второй этап — перенос активированного альдегида на липоевую кислоту — протекает так же, как и с нативным ферментом. Последнее было продемонстрировано путем использования в энзиматической системе вместо пирувата и тиаминпирофосфата оксэтильного производного кофермента — первого промежуточного продукта декарбоксилирования пирувата. Восстановительное ацетилирование остатка липоевой кислоты в данном случае протекало с одинаковой скоростью как с фосфорилированным, так и с нефосфорилированным ферментом.

Одновременно и независимо аналогичные данные о субъединичной структуре пируватдекарбоксилазного компонента пируватдегидрогеназного комплекса получены в лаборатории С. Е. Северина с ферментом, выделенным из грудной мышцы голубя [69]. Под действием тодецилсульфата натрия мышечная пируватдекарбоксилаза распадается на субъединицы с мол. весом 42 000 и 37 000. Мол. вес нативного фермента был определен ранее равным 156 000 [68, 464], из чего авторы делают естественное предположение о субъединичной структуре типа  $\alpha_2\beta_2$ . Интересные данные получены при гельфильтрации пируватдекарбоксилазы грудной мышцы голубя на сефадексе G-200 [68]. Фермент элюировался с колонки одним несимметричным белковым пиком, но тремя достаточно четко ограниченными пиками активности. Положение пиков соответствовало мол. весам 156 000, 104 000 и 68 000. Напрашивается предположение, что в данном случае три формы фермента — тетрамер, тример и димер — находятся в равновесии.

Таким образом, все три фермента, выделенные из разных тканей животных, оказались близкими по своей структуре. Несколько особняком в этом списке стоит пируватдекарбоксилаза, изолированная из пируватдегидрогеназного комплекса сердца свиньи. Хотя

мол. вес ее равен 153 000 [293, 294], т. е. примерно такой же, как и трех вышеупомянутых ферментов, но состоит она из двух идентичных субъединиц [294]. В этом смысле она напоминает фермент, полученный из *E. coli*.

Методом гельфильтрации показано, что оксоглутаратдекарбоксилаза, изолированная из оксоглутаратдегидрогеназного комплекса грудной мышцы голубя, находится в растворе в виде активных олигомерных форм с мол. весом 335 000, 255 000 и 175 000 [10]. Путем экстраполяции к бесконечному разведению получено значение минимального мол. веса, равное 85 000. Это как будто бы указывает на то, что активные формы фермента представляют собой соответственно тетрамер, тример, димер. Зависимость величины коэффициента седиментации от концентрации фермента в растворе дает основание полагать, что активные олигомерные формы оксоглутаратдекарбоксилазы находятся в состоянии равновесия. Диск-электрофорез в полиакриламидном геле фермента, обработанного додецилсульфатом натрия, подтверждает наличие компонента с мол. весом 85 000. Наличие активных олигомерных форм оксоглутаратдекарбоксилазы (изолированной из оксоглутаратдегидрогеназного комплекса), построенных из идентичных или очень близких по свойствам субъединиц, подтверждено и в дальнейших исследованиях [50]. Заметим, что мол. вес субъединиц оксоглутаратдекарбоксилазы, изолированной из оксоглутаратдегидрогеназного комплекса *E. coli*, равен примерно 95 000 [382].

В настоящее время мы располагаем лишь отрывочными данными о субъединичной структуре тиаминных ферментов (табл. 2). Тем не менее их предварительная оценка представляет определенный интерес. При сопоставлении данных, представленных в табл. 2, обращают на себя внимание три обстоятельства: 1) близкие величины молекулярных весов нативных ферментов; 2) практически идентичные свойства пируватдекарбоксилаз, выделенных из грудной мышцы голубя, почек и сердца быка. Все они имеют мол. вес около 155 000, состоят из неидентичных субъединиц с мол. весом соответственно 42 000 и 37 000 и построены по типу  $\alpha_2\beta_2$ ; 3) фермент из растений представлен одной субъединицей, ферменты из микроорганизмов — двумя идентичными, а из животных тканей — двумя парами неидентичных субъединиц.

Таблица 2

## Молекулярный вес некоторых тиаминовых ферментов и их субъединиц \*

| Фермент                              | Источник                        | Мол. вес<br>нативного фер-<br>мента | Воздействие  | Количество<br>субъединиц | Мол. вес<br>субъединиц | Литературный<br>источник |
|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| Транскетолаза                        | Пекарские дрожжи                | 158 000                             | ГХ **        | 2                        | 5 000                  | [119]                    |
| То же                                | То же                           | 159 000                             | pH 12        | 2                        | 80 000                 | [2]                      |
| »                                    | Эритроциты человека             | 136 000                             | —            | —                        | —                      | [218]                    |
| »                                    | Листья шпината                  | 100 000                             | ДСН ***      | 1                        | 100 000                | [529]                    |
| Пируватдекарбоксилаза                | Пивные дрожжи                   | 175 000                             | ГХ **        | 2                        | 90 000                 | [512, 516]               |
| То же                                | Пекарские дрожжи                | 200 000                             | pH 7 → 8     | 2                        | 100 000                | [177]                    |
| Пируватдекарбоксилаза из E. coli     |                                 | 192 000                             | pH 7,0 → 9,5 | 2                        | 96 000                 | [142, 150]               |
| пируватдегидрогеназного<br>комплекса | Сердечная мышца свиньи          | 153 000                             |              | 2                        | 77 000                 | [206, 294]               |
|                                      | Грудная мышца голубя            | 156 000                             | ДСН ***      | 4 (αβ, αβ)               | 42 000<br>37 000       | [68, 69]                 |
|                                      | Почки и сердечная мышца<br>быка | 154 000                             | ДСН ***      | 4 (αβ, αβ)               | 42 000<br>37 000       | [84]                     |

\* Данные о других ферментах слишком фрагментарны и здесь не приводятся.

\*\* Гуанидинхлорид.

\*\*\* Додецилсульфат натрия.

(Исключение составляет пируватдекарбоксилаза из сердца свиньи, состоящая из двух, по-видимому, идентичных субъединиц. Однако этот фермент еще мало изучен, поэтому и в нем, возможно, удастся показать наличие четырех субъединиц.)

Субъединичная структура  $\alpha_2\beta_2$  связана с тонкими механизмами регуляции, характерными для тканей животных, о чем речь пойдет ниже.

## ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА

Исследование вторичной структуры транскетолазы пекарских дрожжей проводили с использованием методов дисперсии оптического вращения и циркулярного дихроизма [26, 283]. В табл. 3 приведены величины  $b_0$  и степени спирализации ( $Hb_0$ ), определяемой по этому параметру. Они максимальны в диапазоне рН от 6 до 8 и равны соответственно —130° и 30%. Абсолютная вели-

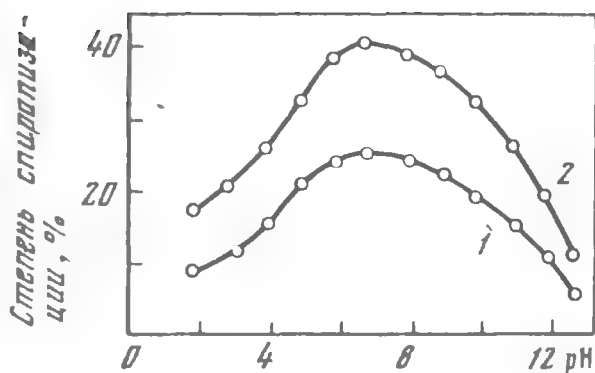
Таблица 3

*Величины параметров уравнений Моффита [360] и Шехтера-Блоцта [468, 469] для транскетолазы и степень спиральности фермента при разных значениях рН [26]*

| рН   | $-b_0$ | $Hb_0$ | $A_{193}$ | $H A_{193}$ для водных растворов, % | $H A_{193}$ для органического растворителя, % | $A_{225}$ | $H A_{225}$ для водных растворов, % | $H A_{225}$ для органического растворителя, % |
|------|--------|--------|-----------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1,9  | 35     | 14     | —100      | 18                                  | 14                                            | —245      | 9                                   | 12                                            |
| 3    | 45     | 16     | 20        | 21                                  | 17                                            | —275      | 11                                  | 15                                            |
| 4    | 85     | 22     | 280       | 28                                  | 24                                            | —385      | 16                                  | 20                                            |
| 5    | 110    | 26     | 390       | 31                                  | 27                                            | —490      | 22                                  | 26                                            |
| 6    | 130    | 30     | 735       | 41                                  | 37                                            | —565      | 25                                  | 30                                            |
| 7    | 140    | 31     | 700       | 40                                  | 36                                            | —560      | 25                                  | 29                                            |
| 7,6  | 130    | 30     | 665       | 39                                  | 35                                            | —555      | 25                                  | 29                                            |
| 8    | 130    | 30     | 665       | 39                                  | 35                                            | —555      | 25                                  | 29                                            |
| 9    | 120    | 28     | 585       | 37                                  | 33                                            | —510      | 23                                  | 27                                            |
| 10   | 90     | 23     | 440       | 33                                  | 29                                            | —420      | 18                                  | 22                                            |
| 11   | 85     | 22     | 285       | 28                                  | 24                                            | —395      | 17                                  | 21                                            |
| 12   | 15     | 11     | —140      | 17                                  | 13                                            | —270      | 11                                  | 14                                            |
| 12,7 | 0      | 8      | —314      | 12                                  | 8                                             | —165      | 5                                   | 9                                             |

Рис. 4. Влияние pH на степень спирализации транскетолазы [26]

Спиральность, рассчитанная по параметрам:  $A_{225}$  (1) и  $A_{193}$  (2)



чина параметра  $b_0$ , а следовательно, и количественное содержание  $\alpha$ -спиральных структур уменьшаются при переходе в более кислую или в более щелочную область. В первом случае это выражено более резко.

По сути дела аналогичные данные о характере влияния pH были получены при определении параметров  $A_{193}$  и  $A_{225}$  и соответствующих им величин степени спирализации транскетолазы —  $II_{A_{193}}$  и  $II_{A_{225}}$  (см. табл. 3 и рис. 4).

Своеобразна форма кривых зависимости степени спирализации от pH (см. рис. 4). Правая ее ветвь, соответствующая деспирализации молекулы фермента в щелочной области, — выпуклая, а левая, отражающая то же самое, но в кислой области, — вогнутая. Вогнутая форма характерна, согласно литературным данным [4, 5], для деспирализации белков, содержащих относительно длинные последовательности однотипных аминокислотных остатков, и осуществляется она в сравнительно узком диапазоне pH.

Для транскетолазы такими остатками могут быть остатки кислых аминокислот, содержащие карбоксильные группы. Уменьшение степени их ионизации по мере снижения pH раствора сопровождалось бы резким уменьшением количественного содержания  $\alpha$ -спиральной формы. При pH ниже 3, когда карбоксильные группы в белке практически полностью протонированы, изменение кислотности среды должно сказываться в значительно меньшей степени. И действительно, снижение pH от 3 до 1,9 сопровождается уже лишь незначительным уменьшением степени спирализации транскетолазы (см. табл. 3).

Остатки основных аминокислот в молекуле фермента распределены, по-видимому, более равномерно, на что указывает выпуклый характер кривой зависимости степени спирализации от рН среды, наблюдаемый в щелочной области (см. рис. 4).

Обратим теперь внимание на значительное расхождение между величинами степени спирализации, определяемыми по параметрам  $A_{193}$  и  $A_{225}$ , которое наблюдалось при всех исследованных значениях рН, хотя и было выражено в неодинаковой степени (рис. 4).

Такое расхождение может указывать либо на наличие гидрофобного окружения спирализованных структур [97, 202], либо на наличие в молекуле фермента, наряду с  $\alpha$ -спиральной структурой, также и  $\beta$ -структуры [468, 469]. Обе эти возможности были исследованы.

Известно [468, 469], что если белок характеризуется наличием в нем статистического клубка и  $\alpha$ -спиральной конформации и не имеет других упорядоченных структур, то для его водных растворов (диэлектрическая постоянная  $\epsilon$  более 30) выполняется такое линейное соотношение:  $A_{225} = -0,55 A_{193} - 430$ , а для белка, находящегося в органическом растворителе ( $\epsilon$  менее 30),  $A_{225} = -0,55 A_{193} - 280$ . Соотношение нарушается, если в молекуле белка содержатся также другие структуры.

Экспериментальные данные, полученные с транскетолазой (см. табл. 3), представлены графически на рис. 5, где показаны результаты определения параметров  $A_{193}$  и  $A_{225}$  при разных значениях рН. Оказалось, что все экспериментальные точки расположены ниже прямой, отражающей линейную зависимость между параметрами  $A_{193}$  и  $A_{225}$  для белков, находящихся в водной среде (1), и часть из них, которая соответствует значениям рН 3, 4, 5 и 11, ложатся на прямую, характерную для белков, находящихся в органических растворителях (2).

Таким образом, подтверждалась первая из двух возможных причин несоответствия степени спирализации, определяемой по параметрам  $A_{193}$  и  $A_{225}$  (см. выше), а именно — спиральные участки транскетолазы находятся в гидрофобном окружении, т. е. расположены внутри белковой молекулы фермента. Исходя из этого, была рассчитана степень спирализации транскетолазы по параметрам  $A_{193}$  и  $A_{225}$  так, как будто бы фермент находился в органическом растворителе (см. табл. 3).

Рис. 5. График Шехтера и Блоута зависимости  $A_{225}$  от  $A_{193}$  [26]

1 — для водных растворов;  
2 — для органического растворителя. Точки соответствуют каждой паре значений параметров  $A_{225}$  и  $A_{193}$ , найденных при анализе кривых дисперсии оптического вращения транскетолазы по уравнению Шехтера и Блоута для соответствующего pH

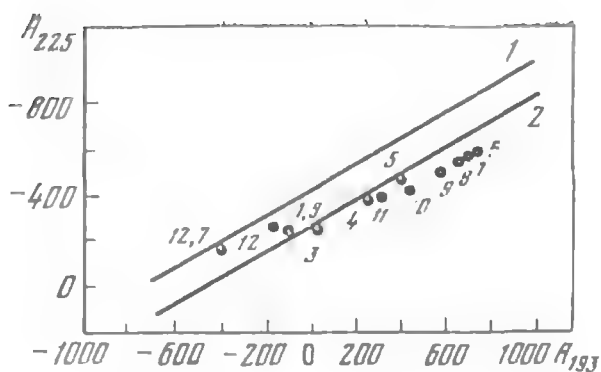
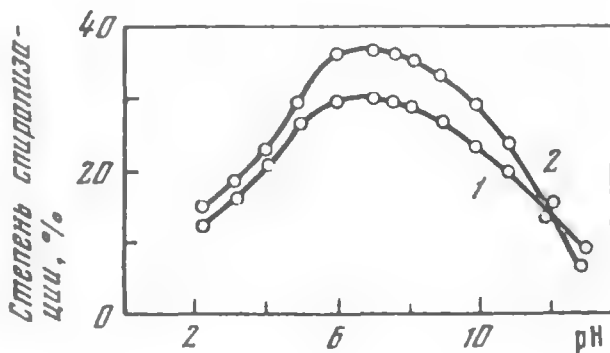


Рис. 6. Спиральность транскетолазы при разных значениях pH, как это найдено из параметров уравнения Шехтера и Блоута для органического растворителя [26]

Спиральность, рассчитанная по параметрам:  $A_{225}$  (1) и  $A_{193}$  (2)



Как следует из данных рис. 6, различия в степени спирализации стали не так резко выражены (сравни рис. 6 и рис. 4). Так как результаты, представленные на рис. 6, рассчитывались для среды и органического растворителя, оставшееся расхождение теперь уже нельзя объяснить наличием гидрофобного окружения спирализованных участков в молекуле фермента.

Остается признать, что здесь выявляется вторая возможность, объясняющая причину неодинаковой степени спирализации транскетолазы, определяемой по разным параметрам — наличие в молекуле фермента не только спиральной конформации, но и  $\beta$ -структуры.

Это подтверждают результаты, полученные при анализе кривых дисперсии оптического вращения и циркулярного дихроизма транскетолазы, снятых в области поглощения пептидной группы (рис. 7, 8). Кривые эти не характерны ни для спектра  $\alpha$ -спиральной структуры, ни для  $\beta$ -конформации и отражали скорее суммарный вклад этих структур в оптическую активность фермента. Так, в случае дисперсии оптического вращения типичный

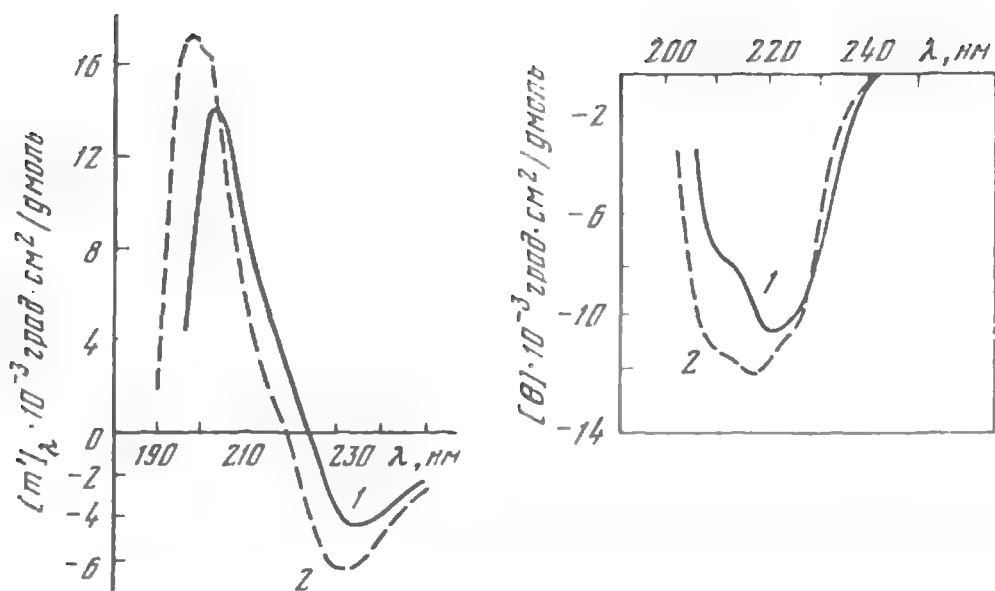


Рис. 7. Спектр дисперсии оптического вращения апотранскетолазы в  $2 \cdot 10^{-3}$  М трис-буфере, рН 7,6 [283]

1 — экспериментальная кривая (концентрация белка 0,16 мг/мл); 2 — расчетная кривая (20%  $\alpha$ -спиралей, 40%  $\beta$ -форм, 40% — клубка). Кювета — 1 мм

Рис. 8. Спектр циркулярного дихроизма апотранскетолазы в  $2 \cdot 10^{-3}$  М трис-буфере, рН 7,6 [283]

1 — экспериментальная кривая (концентрация белка 0,62 мг/мл); 2 — расчетная кривая (20%  $\alpha$ -спиралей, 40%  $\beta$ -форм, 40% — клубка). Кювета — 1 мм

спектр белковых структур с высоким содержанием  $\alpha$ -спиральных участков имеет пик при 198 нм [558], а структуры с преимущественным содержанием  $\beta$ -конформации показывают наличие пика при 205—208 нм [430]. Экспериментально обнаруженный пик на кривой дисперсии оптического вращения транскетолазы (при 204 нм; см. рис. 7, кривая 1) занимает промежуточное положение, несколько менее удаленное от области, характерной для  $\beta$ -структуры, по сравнению с положением пика, свойственным  $\alpha$ -структуре. Положение впадины на кривых дисперсии оптического вращения  $\alpha$ -спиральной конформации и  $\beta$ -конформации различается несущественно; 233 нм — в первом случае и 230 нм — во втором [183]. Впадина кривой дисперсии оптического вращения транскетолазы находится при 232—233 нм (см. рис. 7, кривая 1). Хотя и менее определенно, чем раньше (когда сравнивалось расположение пиков), но



и здесь все же можно говорить о промежуточном положении впадины кривой дисперсии оптического вращения транскетолазы и общем вкладе в оптическую активность фермента обоих типов упорядоченных структур.

Более четкие, хотя по существу аналогичные, данные были получены при анализе кривых циркулярного дихроизма. Действительно, спектр циркулярного дихроизма транскетолазы характеризуется наличием одного отрицательного пика при 220—222 нм и плеча при 212—214 нм (см. рис. 8, кривая 1). Белковые структуры с  $\beta$ -конформацией также имеют (в диапазоне 220—250 нм) один отрицательный пик, но при 217—218 нм. В случае же  $\alpha$ -конформации имеется два отрицательных пика — при 222 нм и в области 206—209 нм [184, 505]. На основании данных, полученных при изучении дисперсии оптического вращения и циркулярного дихроизма в коротковолновой области спектра, было определено относительное содержание в транскетолазе различного типа конформаций, участвующих в построении пространственной структуры молекулы фермента. Для этого, согласно методу, предложенному Гринфильд и сотр. [183, 184], экспериментальные кривые дисперсии оптического вращения и циркулярного дихроизма, полученные для транскетолазы, сопоставляли с известными кривыми для поли-L-лизина, полученными при различном соотношении в нем  $\alpha$ -спиральной конформации,  $\beta$ -структуры и клубкообразной конформации. Наилучшее соответствие по общей форме, положению пиков и точек пересечения с нулевой линией наблюдалось при сопоставлении экспериментальных кривых с кривыми для поли-L-лизина, содержащего 20%  $\alpha$ -спиралей, 40%  $\beta$ -формы и 40% клубка (см. рис. 7, 8).

В настоящее время трудно сказать точно, насколько найденные величины отражают действительное содержание отдельных структур в молекуле транскетолазы. Хорошо известно, что целый ряд факторов, которые еще недостаточно изучены и обычно не учитываются при количественных расчетах тех или иных структур в белке, могут влиять на его оптическую активность. К ним относятся длина и пространственное расположение спиральных участков, наличие дисульфидных связей, Коттон-эффекты остатков ароматических аминокислот, аполярное окружение спирализованных участков (о чем

подробнее говорилось выше) и многие другие [421, 430, 470, 490, 502]. Этим в основном и объясняется несоответствие результатов, получаемых разными методами. Так, например, согласно данным рентгеноструктурных исследований, в молекуле лизоцима содержится 35% спиральной формы, 10%  $\beta$ -структуры и 55% статистического клубка. В то же время методом Гринфильд и сотр. обнаружено соответственно 26, 26 и 48% [183]. Несовпадение экспериментальных величин, определяемых разными методами, отмечалось при исследовании и других белков, но выражено оно было в меньшей степени.

С учетом всего вышесказанного можно считать, что примерное содержание отдельных структур в молекуле транскетолазы равно:  $\alpha$ -спирали — 20%,  $\beta$ -форма — 40, статистический клубок — 40%. В щелочной области происходит разрушение  $\beta$ -формы; полное — при рН выше 11. В кислой области она более стабильна.

## РЕНАТУРАЦИЯ ТРАНСКЕТОЛАЗЫ

Ренатурацию транскетолазы после ее выдерживания при различных значениях рН осуществляли следующим доведением рН до 8 путем добавления соответствующего буфера или диализом против того же буфера [26]. В обоих случаях при ренатурации фермента из кислых растворов наблюдалось образование осадка, если концентрация белка в исходном растворе была относительно высокой. Лишь при концентрации, равной 0,2 мг/мл и ниже, осадок не образовывался. Такая концентрация недостаточна для исследований фермента методом дисперсии оптического вращения, тем более, что в процессе проведения ренатурации она еще снижается вдвое. Поэтому возможность восстановления оптических характеристик фермента после его кислотной денатурации не исследовали и ограничились областью щелочных воздействий. Восстановление же активности, для определения которой требовались лишь незначительные количества фермента, исследовали во всем диапазоне рН от 1,75 до 12,7.

Как следует из данных, приведенных в табл. 4, в щелочных условиях наблюдается резкое уменьшение сте-

Таблица 4

Обратимость конформационных изменений транскетолазы  
после щелочной денатурации [26]

| Параметры<br>дисперсии<br>оптического<br>вращения | рН 8 | рН 11            |                  | рН 12            |                  | рН 12,7          |                  |
|---------------------------------------------------|------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                                   |      | денату-<br>рация | ренату-<br>рация | денату-<br>рация | ренату-<br>рация | денату-<br>рация | ренату-<br>рация |
| $b_0$                                             | —130 | —85              | —126             | —15              | —120             | 0                | —120             |
| $Hb_0$ , %                                        | 30   | 22               | 29               | 11               | 28               | 8                | 28               |
| $A_{193}$                                         | 665  | 285              | 625              | —140             | 570              | —314             | 450              |
| $H_{A_{193}}$ , %                                 | 39   | 28               | 38               | 17               | 36               | 12               | 33               |
| $A_{225}$                                         | —555 | —395             | —560             | 270              | —510             | —165             | —450             |
| $H_{A_{225}}$ , %                                 | 25   | —17              | 26               | 11               | 23               | 5                | 20               |

пени спирализации транскетолазы по сравнению с исходным ее состоянием. При ренатурации общая структура в основном восстанавливается, хотя отдельные характеризующие ее параметры восстанавливаются в неодинаковой степени.

Несколько иная картина наблюдается при измерении каталитической активности ренатурированного фермента (рис. 9). Только после денатурации при рН 8—9 (в данном случае рассматриваются лишь щелочные условия денатурации) она остается практически неизменной. С переходом в более щелочную область активность снижается, а в результате выдерживания при рН 12 снижается более чем наполовину.

Таким образом, при ренатурации общая конформация транскетолазы восстанавливается значительно легче, чем ее ферментативная активность. Это и не удивительно, так как «общая конформация» — достаточно грубая характеристика, если идет речь о возможных незначительных изменениях структуры, касающихся локальных участков белковой молекулы. А именно такие изменения, происходящие в тонко организованном участке активного центра фермента, и могут быть решающими для проявления каталитической активности.

Из приведенных выше экспериментальных данных, однако, еще не следует, что те локальные изменения тонкой структуры транскетолазы, которые сопровождаются (или являются причиной) потерей ферментативной

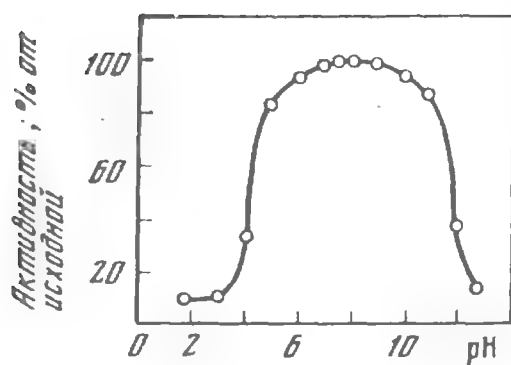


Рис. 9. Активность транскетолазы, предварительно выдержанной при различных значениях pH [26]

активности, вообще необратимы. Считается [1, 76, 151, 195, 334], что формирование нативной структуры белка осуществляется спонтанно и определяется составом и последовательностью аминокислотных остатков полипептидной цепи. Это было показано на примере многих ферментов, когда после применения жестких денатурирующих воздействий происходило полное разупорядочивание белковой молекулы, а затем, после снятия этих воздействий, наблюдалось восстановление исходной структуры и каталитической активности. С низкомолекулярными, одноцепочечными ферментами типа рибонуклеазы активность ренатурированных ферментов не отличалась от их активности до денатурации, причем дисульфидные связи, если они первоначально имелись и были разорваны при денатурации, образовывались при участии тех же самых цистеиновых остатков, как это было характерно для нативного фермента [77, 544, 545].

Следует, однако, заметить, что для восстановления всех связей, разорванных в процессе денатурации, и нативных свойств фермента требовался подбор соответствующих условий и сам процесс ренатурации зачастую осуществлялся довольно медленно. Например, в случае панкреатической рибонуклеазы необходимо было даже добавить специальный «сшивающий» фермент, чтобы повысить скорость и степень ее реактивации [141, 162, 168, 175].

Нельзя поэтому исключить, что в определенных условиях можно полностью восстановить и активность транскетолазы, денатурированной при экстремальных значениях pH.

В молекуле белка, структура которого в значительной степени (но не полностью) разрушена денатурирую-

иными воздействиями, предполагается наличие определенных участков, выполняющих роль своего рода «структурного ядра», которое способствует последующей ренатурации и восстановлению «правильной» нативной конформации или каким-то образом определяет их. Такое «ядро» может быть или гидрофобным — в случае белков с очень низкой степенью спирализации [47], или спирализованным [221] (при этом не исключается и возможная другая его природа).

Можно думать, что такое спирализованное «ядро» имеется и в молекуле транскетолазы, свидетельством чему является еще достаточно высокое содержание спиральных структур при рН 3 и 12, которое лишь в слабой степени изменяется при дальнейшем смещении рН соответственно в кислую и щелочную область. В то же время, когда рН смещали от 4 до 3 и от 11 до 12, степень спирализации менялась существенно (см. табл. 3, третья колонка).

## ИЗОФОРМЫ

### *Идентификация изоформ транскетолазы пекарских дрожжей и их препаративное получение*

При электрофорезе высокоочищенных препаратов транскетолазы в полиакриламидном геле в системах ЭДТА — *трис* — борная кислота (рН разделения 8,9; рис. 10, 1) и пиридин — КОН — уксусная кислота (рН разделения 6; рис. 10, 3) было получено четкое разделение на две белковые фракции [277]. Во второй системе, наряду с двумя основными белковыми фракциями, как правило, обнаруживалась еще одна слабо заметная белковая полоса, которая является инактивированной формой транскетолазы, образующейся в процессе проведения эксперимента (мы к этому еще вернемся при дальнейшем изложении материала). Ее не было при электрофорезе свежесодельенных высокоочищенных препаратов транскетолазы в ЭДТА-*трис*-боратной системе, но она появлялась, если для анализа использовали хранившийся препарат фермента, частично потерявший свою каталитическую активность.

Рис. 10. Электрофоретическое разделение транскетолазы в полиакриламидном геле [277]

Системы разделения: 1, 2 — ЭДТА — трис-борная кислота, pH 8,9; 3 — пиридин — КОН — уксусная кислота, pH 6,0; покрашено на белок (1, 3) и на активность (2)

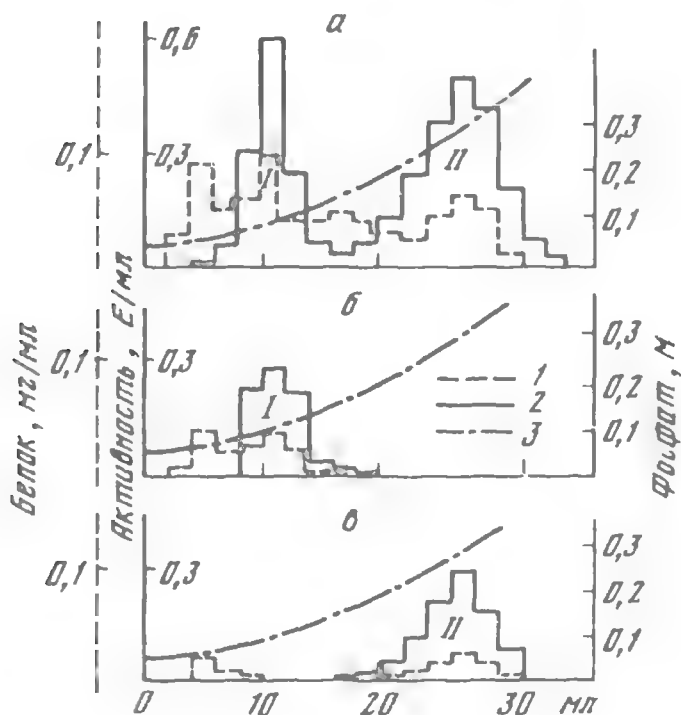


Рис. 11. Хроматографирование транскетолазы на КМ-сефадексе (а) и рехромаатография индивидуальных изоформ (б и в) [277]

Колонка уравновешена  $5 \cdot 10^{-2}$  М калий-фосфатным буфером, pH 5,7  
1 — белок; 2 — ферментативная активность; 3 — концентрация элюирующего раствора

Обе белковые фракции, разделяемые при электрофорезе, характеризовались транскетолазной активностью, выявляемой гистохимически в соответствующей системе по реакции с нитроглубым тетразолем (см. рис. 10, 2).

Первые попытки разделить изоформы транскетолазы,

применив для этой цели метод ионообменной хроматографии, окончились неудачей. Были использованы различные ионообменники, работу проводили в достаточно широком диапазоне рН (от 6,5 до 9,5), тем не менее во всех случаях фермент элюировался с колонки одним, хотя и не всегда симметричным пиком.

Аналогичные результаты были получены и при работе в условиях более низких значений рН, когда колонка была уравновешена  $5 \cdot 10^{-2}$  М калий-фосфатным буфером (рН 5,7) и для элюции использовали раствор хлористого калия в том же буфере. Если, не меняя рН, колонку уравновесить ацетатным буфером и ацетатным же буфером проводить последующую элюцию фермента, то уже намечается частичное разделение изоформ транскетолазы. Практически полно разделить их удалось только при использовании в качестве элюирующего раствора калий-фосфатного буфера. Снимались они с колонки при концентрации буфера, равной соответственно  $1 \cdot 10^{-1}$  М и  $2 \cdot 10^{-1}$  М (рис. 11, а).

Во всех случаях, когда работа проводилась при рН 5,7, обнаруживалась белковая фракция, лишенная транскетолазной активности (рис. 11, а). Появлялась она и при повторной хроматографии индивидуальных изоформ (рис. 11, б, в). Эта фракция — результат инактивации транскетолазы в процессе подготовки и проведения эксперимента (фермент не стабилен при рН 5,7). Ее содержалось тем больше, чем меньше общей транскетолазной активности, по отношению к исходной, обнаруживалось в элюате.

Чтобы снизить количество неактивной фракции, снимаемой с колонки, элюцию осуществляли градиентом рН исходного калий-фосфатного буфера, которым была уравновешена колонка. Ожидаемого эффекта, однако, не получилось. Хотя фермент и снимался в более благоприятных условиях для его стабильности (рН > 5,7), тем не менее количество неактивной фракции практически не уменьшалось. Кроме того, происходило значительное размывание пика одной из изоформ.

В процессе повторной хроматографии при рН 5,7 каждой из индивидуальных изоформ в отдельности другая изоформа не обнаруживалась (см. рис. 11, б, в). Следовательно, при рН 5,7 одна изоформа не может переходить в другую; во всяком случае — с заметной скоро-

стью. Однако этого нельзя было исключить при более высоких значениях pH, где фермент при хроматографировании его на ионообменных колонках всегда элюировался одним пиком и мог быть представлен только одной изоформой.

Для проверки такой возможности были поставлены соответствующие эксперименты. В первой серии опытов фермент выдерживали некоторое время при pH 9, после чего хроматографировали при pH 5,7, как указано на рис. 11. Получали обычное разделение на две активные фракции, характерные для данных условий хроматографирования. Во второй серии опытов изоформы сначала изолировали путем хроматографирования на КМ-сефадексе при pH 5,7. Затем каждую из них хроматографировали при pH 9,0 на ДЭАЭ-сефадексе, получая при этом по одной активной белковой фракции. И, наконец, каждую из них, опять же раздельно, хроматографировали еще раз на КМ-сефадексе при pH 5,7.

Профиль элюции был тот же, что и при обычном повторном хроматографировании индивидуальных изоформ фермента, без предварительного их пропускания при pH 9 через колонку, заполненную ДЭАЭ-сефадексом.

Таким образом, и при pH 9 переход одной изоформы в другую не происходит. Обе они присутствуют в растворе, но не разделяются, несмотря на использование различных ионообменников и разных условий разделения. Достичь этого удастся только при низких значениях pH и только при использовании калий-фосфатного буфера на всех стадиях проведения эксперимента [277]. Фосфат, как мы увидим дальше, способен взаимодействовать с транскетолазой. Физико-химические свойства изоформ при этом изменяются, по-видимому, неодинаково, что и дает возможность их разделить на ионообменном сефадексе. Изменения эти обратимы, и после удаления фосфата изоформы возвращаются к своему первоначальному состоянию. Такой вывод следует из опытов, в которых препарат фермента сначала выдерживали при pH 5,7 в 1 М калий-фосфатном буфере, затем удаляли фосфат пропусканием через сефадекс G-50 и проводили обычное хроматографирование при pH 5,7, используя в качестве элюирующего раствора хлористый калий вместо фосфатного буфера. Изоформы при этом не разделялись, и вся активность обнаруживалась в одном пике.



Изоформы транскетолазы были выделены с помощью препаративных колонок и получены в кристаллическом виде. Условия их разделения использовались те же, что указаны на рис. 11.

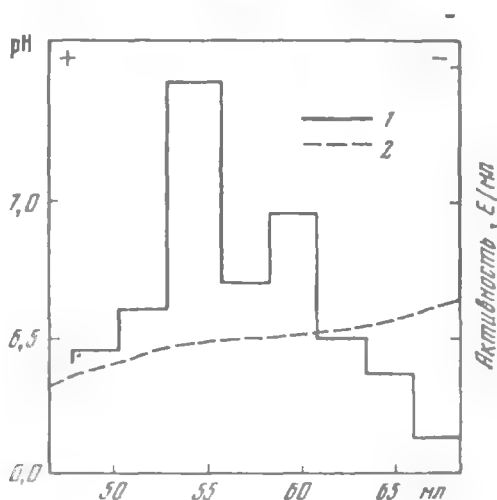
### *Некоторые свойства изоформ транскетолазы*

Изоформы были гомогенны, согласно данным ультрацентрифугирования (при рН 6,4 в  $2 \cdot 10^{-2}$  М калий-фосфатном буфере), имели одинаковую величину коэффициента седиментации, равную той, которая была получена для исходного препарата фермента до его разделения на изоформы. Не обнаружено существенных различий и в общей структуре при исследовании методом дисперсии оптического вращения.

Изоэлектрические точки, найденные методом изоэлектрического фокусирования, оказались очень близкими (рис. 12): для изоформы I—6,43, а для изоформы II—6,50. Именно по этой причине изоформы так трудно было разделить методом ионообменной хроматографии.

Рис. 12. Изоэлектрическое фокусирование транскетолазы [2]

1 — транскетолазная активность; 2 — значения рН во фракциях элюата



Изоформы достаточно стабильны при рН около 7,6 и частично инактивируются при смещении рН как в кислую область, о чем уже говорилось выше, так и в щелочную (рН 9 и выше). В первом случае более неустойчива изоформа II, а во втором случае — изоформа I. В присутствии фосфата снижение ферментативной активности замечалось. Особенно наглядно это проявлялось в случае изоформы II.

В препаратах транскетолазы, частично разобщенных от кофакторов, изоформа II всегда была представлена только апоферментом, а изоформа I — смесью апо- и холофермента [70]. Другими словами, вся холотранскетолаза, первоначально присутствовавшая в исходном ферментном препарате, затем обнаруживалась только во фракции, соответствовавшей изоформе I. Создается впечатление, что прочность связи тиаминпирофосфата с изоформами неодинакова. С изоформой II она менее прочная, и кофермент легко отщепляется в процессе выделения и хранения ферментных препаратов.

Более того, если при использовании различных препаратов апофермента соотношение в нем изоформ определялось всегда примерно одинаковым (таким, как на рис. 11, а), то в частично разобщенных препаратах транскетолазы оно существенно зависело от относительного содержания в них апофермента. Чем оно было выше, тем больше обнаруживалось изоформы II и, соответственно, меньше изоформы I (холофермент вообще показывал наличие только изоформы I). Такая закономерность наблюдалась до тех пор, пока соотношение изоформ не становилось равным тому, которое характерно для апофермента (содержание холофермента в препарате было при этом еще достаточно высоким). После этого оно не изменялось, несмотря на то, что относительное содержание апотранскетолазы в ферментном препарате продолжали повышать за счет уменьшения холотранскетолазы [70].

Итак, в апотранскетолазе обнаруживаются две формы фермента, а в холотранскетолазе — только одна. Здесь могут иметь место две возможности.

1. Холотранскетолаза также представлена двумя изоформами, но они не разделяются теми методами, которые использовали в работе. Возможно, потому, что фосфат не взаимодействует с холотранскетолазой так, как с апоферментом, где проявлялось его специфическое влияние, позволившее идентифицировать изоформы (см. рис. 11).

2. При взаимодействии с тиаминпирофосфатом и образовании холотранскетолазы изоформа II переходит в изоформу I, и холофермент, таким образом, представлен только одной формой.

В связи с материалом, изложенным в настоящем разделе, по-видимому, уместно привести результаты, полу-

ченные с препаратами фермента, больше года хранившиеся на холоду в виде суспензии кристаллов в сульфате аммония 40—50% насыщения. Каталитическая активность таких препаратов сохраняется, как правило, неизменной, кофермент, естественно, полностью отщепляется. При попытке растворить такие ферментные препараты в воде или буфере лишь часть фермента переходит в раствор. Оставшийся осадок можно многократно промывать водой, и он не растворится. Лишь в присутствии магния и тиаминпирофосфата, взятых в достаточно высоких концентрациях, он начинает растворяться. Оказалось, что в растворимой фракции обнаруживается (если судить по величине транскетолазной активности) около 60% общего количества фермента, а в «нерастворимой» фракции — 40%, т. е. соотношение получается примерно такое же, как и для изоформ транскетолазы (см. рис. 11).

## Глава пятая

# ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ

### СУЛЬФИДРИЛЬНЫЕ ГРУППЫ

Многие тиаминовые ферменты ингибируются сульфгидрильными реагентами и активируются (особенно в высокоочищенном состоянии) такими соединениями, как цистеин, меркаптоэтанол или восстановленный глутатион [65, 78, 85, 209, 242, 294, 363, 478, 557]. Эти данные указывают на то, что сохранность сульфгидрильных групп необходима для нормального функционирования тиаминовых ферментов; по крайней мере, большинства из них. Применительно к некоторым ферментам этот вопрос был изучен более подробно.

Всего в молекуле апопируватдекарбоксилазы, изолированной из пируватдегидрогеназного комплекса *E. coli*, определяется восемь сульфгидрильных групп. При нейтральной реакции среды две из них относительно быстро реагируют с органическими соединениями ртути, такими как *n*-меркурибензолсульфонат и *n*-меркурибензоат. При молярном отношении реагента к ферменту, равном 5:1, взаимодействие заканчивается за 2 мин. Фермент при этом полностью теряет каталитическую активность, которая может быть восстановлена добавлением цистеина [456]. Молекула пируватдекарбоксилазы из *E. coli* состоит из двух субъединиц и имеет коэффициент седиментации, равный 9,2S. После связывания в ферменте двух сульфгидрильных групп величина коэффициента седиментации не изменяется. Следовательно, инактивация пируватдекарбоксилазы не сопровождается ее распадом на субъединицы.

Пируватдекарбоксилаза в пируватдегидрогеназном комплексе связана с липоилтрансацилазой. Чтобы выяснить, не влияет ли на связывание блокирование сульфгидрильных групп пируватдекарбоксилазы, ставили

следующие эксперименты [456]. Пируватдекарбоксилазу обрабатывали *n*-меркурибензолсульфонатом, используя его в такой концентрации, чтобы фермент был заингибирован примерно на 80%. Обработанный таким образом фермент смешивали с липоилтрансацилазой. Часть смеси исследовали в ультрацентрифуге на наличие комплекса пируватдекарбоксилаза — липоилтрансацилаза, а другую часть использовали для определения ферментативной активности как в полной системе (с использованием липоилдегидрогеназы и НАД), так и в искусственной системе с феррицианидом в качестве акцептора электронов. Оказалось, что образование комплекса пируватдекарбоксилаза — липоилтрансацилаза происходит совершенно одинаково как с нативным ферментом, так и с ферментом, обработанным сульфгидрильным реагентом. Величина остаточной активности пируватдекарбоксилазы после ее комплексования с липоилтрансацилазой также не изменялась. Количество титруемых сульфгидрильных групп и их реакционность в свободной пируватдекарбоксилазе и в составе комплекса были идентичны. Приведенные данные указывают на то, что активный центр пируватдекарбоксилазы и ее участок связывания с липоилтрансацилазой независимы.

Степень инактивации пируватдекарбоксилазы под действием сульфгидрильного реагента существенно снижалась при совместном добавлении тиаминпирофосфата и магния. Магний сам по себе, а также пировиноградная кислота никакого влияния не оказывали [456]. Заметим, что в то время как в апоферменте быстро титруемых SH-групп было две, в холоэнзиме их определялось четыре [456]. Более того, связывание в последнем случае двух групп никак не сказывалось на величине ферментативной активности. Только когда были блокированы и две другие группы, активность снижалась до нуля. Эти две сульфгидрильные группы, существенные для активности, очевидно, те -самые, которые титруются в апоферменте.

Приведенные экспериментальные данные указывают на то, что две сульфгидрильные группы, существенные для активности, расположены вблизи активного центра. Связывание тиаминпирофосфата с апоферментом предохраняет их от блокирования и вызывает изменение конформации белка, в результате чего открываются две другие сульфгидрильные группы, несущественные для

активности. На том основании, что пируват не защищает пируватдекарбоксилазу *E. coli* от инактивации *n*-меркурибензолсульфонатом, авторы [456] приходят к выводу, что сульфгидрильные группы не участвуют в связывании субстрата данным ферментом. Такой вывод нам кажется преждевременным потому, что, например, апопируватдекарбоксилаза из пивных дрожжей тоже не предохраняется пируватом от ингибирования сульфгидрильными реагентами, в то время как холофермент предохраняется полностью [433]. Защитное же действие пирувата по отношению к холопируватдекарбоксилазе *E. coli*, судя по опубликованным данным, не исследовалось. Более того, для пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей получены убедительные доказательства в пользу непосредственного взаимодействия субстрата с сульфгидрильной группой данного фермента, в результате чего образуется полумеркапталъ [439].

В пируватдекарбоксилазе, изолированной из пируватдегидрогеназного комплекса грудной мышцы голубя, амперометрически и спектрофотометрически (по реакции с *n*-хлормеркурибензоатом) титруется 25—27 сульфгидрильных групп [65]. Реакционность их неодинакова. Легко определяется 16—18 групп, в то время как связывание остальных осуществляется только при длительном выдерживании с реагентом. Скрытые сульфгидрильные группы, очевидно, отсутствуют, так как в присутствии 6—8 М мочевины определяется тоже 25—27 SH-групп.

Блокирование SH-групп сопровождается снижением ферментативной активности. Так, при связывании двух групп активность снижена на 17%. Степень ингибирования прямо пропорциональна количеству модифицированных SH-групп, и когда двадцать групп оказываются модифицированными — активность снижается до нуля. Таким образом, сохранение двадцати сульфгидрильных групп фермента необходимо для проявления полной каталитической активности пируватдекарбоксилазы.

Инактивация пируватдекарбоксилазы зависит не только от количества связанного сульфгидрильного реагента, но и от последующего времени выдерживания, в течение которого степень меркаптизации не изменяется (рис. 13). Таким образом, можно выделить две стадии инактивации фермента. Первая — быстрая, обусловленная блокированием SH-групп, и вторая — медленная,

связанная с последующими изменениями в белковой молекуле. Необходимость модификации большого количества сульфгидрильных групп для достижения полного ингибирования, двустадийность процесса инактивации, а также уменьшение коэффициента седиментации и гетерогенность препаратов пируватдекарбоксилазы, обработанных *n*-хлормеркурибензоатом [65, 464], — все это указывает на то, что SH-группы (по крайней мере, большая их часть) необходимы для поддержания нативной структуры данного фермента. Ни пируват (субстрат пируватдекарбоксилазы), ни магний не влияли на результаты титрования SH-групп. Количество их, определенное методом амперометрического титрования, однако, снижалось в присутствии кофермента, и при его концентрации, равной  $4 \cdot 10^{-3}$  М, сульфгидрильные группы не обнаруживались. Фермент при этом показывал полную активность.

Здесь могут быть две возможности.

1. Кофермент неспецифически взаимодействует с SH-группами, предохраняя их от меркаптизации, а фермент от инактивации (хотя в модельных опытах с глутатионом это не подтвердилось: количество титруемых сульфгидрильных групп при добавлении тиаминпирофосфата не изменялось [65]).

2. Изменение конформации белковой молекулы в результате специфического связывания кофермента в активном центре пируватдекарбоксилазы. Именно эта возможность предполагается самими авторами [65, 464]. Действительно, изменения конформации при образовании холоэнзима показаны для ряда тиаминовых ферментов, но они столь незначительны, что, по-видимому, захватывают только ограниченный участок белковой моле-

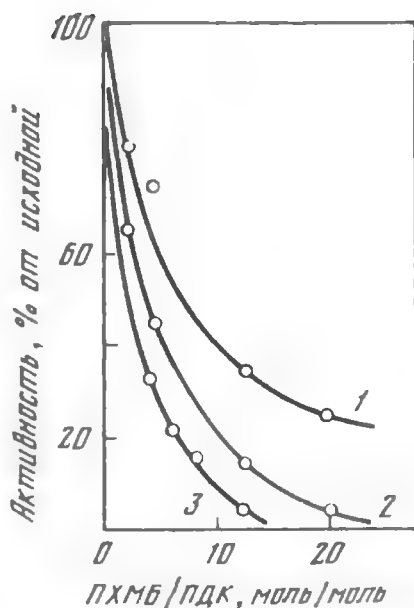


Рис. 13. Влияние *n*-хлормеркурибензоата на активность пируватдекарбоксилазы, изолированной из пируватдегидрогеназного комплекса грудной мышцы голубя [65]

Время преникубации фермента с ПХМБ: 1 — 2 мин; 2 — 20 мин; 3 — 24 ч

кулы и вряд ли могут обеспечить существенное изменение реакционноспособности всех сульфгидрильных групп фермента, тем более, когда их так много, как в рассматриваемом случае.

Пируватдекарбоксилаза, изолированная из пируватдегидрогеназного комплекса сердечной мышцы свиньи, содержит 27—36 сульфгидрильных групп на молекулу белка. Фермент ингибировался органическими соединениями ртути. Предварительная инкубация с тиаминпирогликофосфатом и пируватом значительно снижала степень ингибирования [294]. Отсутствие опубликованных экспериментальных данных не позволяет сравнить эти результаты с результатами, полученными с пируватдекарбоксилазой грудной мышцы голубя.

В ацетолактатсинтетазе *Aerobacter aerogenes* при pH 8 определяются три сульфгидрильные группы [506]. Реакционноспособность их примерно одинакова. Блокирование SH-групп сопровождается снижением ферментативной активности. При связывании одной группы достигается 60% ингибирования. Пируват никакого влияния не оказывает, а в присутствии фенилпирувата (конкурентного аналога субстрата) количество определяемых SH-групп равно двум. Авторы полагают, что одна сульфгидрильная группа (предохраняемая от блокирования фенилпируватом) расположена в непосредственной близости от субстрат-связывающего участка. Всего же в молекуле ацетолактатсинтетазы четыре сульфгидрильные группы, причем четвертая группа становится доступной для титрования не только в додецилсульфате натрия, но и при добавлении ацетата, который является активатором фермента: в его присутствии активность фермента при pH 5,8 увеличивается вдвое [487].

## ИМИДАЗОЛЬНЫЕ ГРУППЫ ОСТАТКОВ ГИСТИДИНА

### *Изменение активности транскетолазы пекарских дрожжей в процессе ее фотооблучения*

В качестве сенситизатора использовали метиленовый синий. Источником излучения служила лампа накаливания мощностью 200 вт. Исследования проводили при



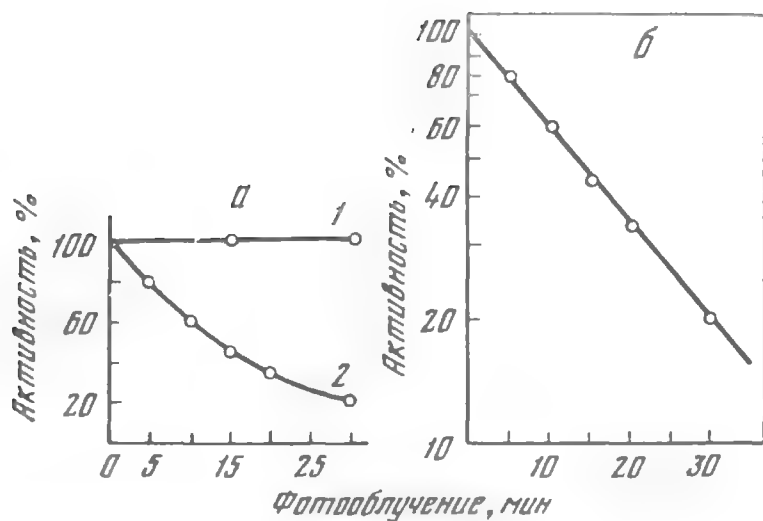


Рис. 14. Фотоннактивация транскетолазы [22]

1 — контрольные пробы (на свету без метиленового синего и с метиленовым синим, но в темноте); 2 — фотооблучение в присутствии метиленового синего; б — то же, что и а (кривая 2), но в полулгарифмических координатах

комнатной температуре в атмосфере воздуха. В этих условиях фермент быстро инактивировался — через 15 мин облучения оставалось менее 50% исходной активности (рис. 14, а, кривая 2). Инактивация была обусловлена исключительно воздействием фотооблучения в присутствии сенсibilизатора, так как сами по себе ни метиленовый синий, ни выдерживание на свету никакого влияния на транскетолазу не оказывали — активность в контроле в процессе проведения эксперимента сохранялась на исходном уровне (см. рис. 14, а, кривая 1).

Заметим, что при исследованиях методом фотоокисления, как правило, используют более жесткие условия по сравнению с приведенным случаем, т. е. опыты проводятся при интенсивной аэрации фотооблучаемых проб с применением мощного источника излучения, а в некоторых случаях и при достаточно высокой температуре — до 40° [3, 140, 539, 540, 543]. Согласно литературным данным, из всех способных фотоокисляться аминокислот наиболее восприимчив при рН 7,6 (условия проведения описываемых экспериментов) — гистидин. Это было неоднократно показано и в модельных системах со свободными аминокислотами [87, 539, 540, 543], и при исследовании различных ферментов [159, 342, 362, 543].

При графическом изображении экспериментальных данных по фотонинактивации транскетолазы, приведенных на рис. 14, а (кривая 2) в полулогарифмических координатах, получается прямая линия (см. рис. 14, б). Этот график описывается уравнением первого порядка.

$$\frac{A_t}{A_0} = e^{-K_A \cdot t},$$

где  $A_0$  — исходная активность транскетолазы,  $A_t$  — активность через интервал времени  $t$ ,  $K_A$  — константа скорости инактивации. Таким образом, фотонинактивация транскетолазы, так же как и фотоокисление свободных аминокислот, — реакция первого порядка. Другими словами, фотонинактивация транскетолазы — результат разрушения одного аминокислотного остатка (или нескольких, но однотипных), сохранение которого необходимо для проявления каталитической активности данного фермента. Промежуточные формы фермента, с частично сохранившимися каталитическими свойствами, при этом не образуются [342, 404, 405, 543].

### *Изменение спектра транскетолазы в результате ее фотооблучения*

Спектрофотометрические исследования фотоокисленных ферментов с целью идентификации функциональных групп, разрушающихся в процессе фотооблучения, оказываются наиболее эффективными в тех случаях, когда фотоокисляются только остатки гистидина, в то время как остатки других аминокислот не разрушаются. Так как именно такой вариант предполагался для транскетолазы, то и были проведены соответствующие исследования.

На рис. 15 изображен дифференциальный спектр фотооблученной транскетолазы (степень фотонинактивации фермента в данном случае составляла 50%). Такой тип дифференциального спектра обычно получается при фотоокислении гистидина, причем и в модельных системах [159, 530, 542], и в том случае, когда он входит в состав молекулы белка [159, 160, 417, 542]. Был даже предложен количественный метод определения гистидина, разрушающегося в процессе фотоокисления, который дал

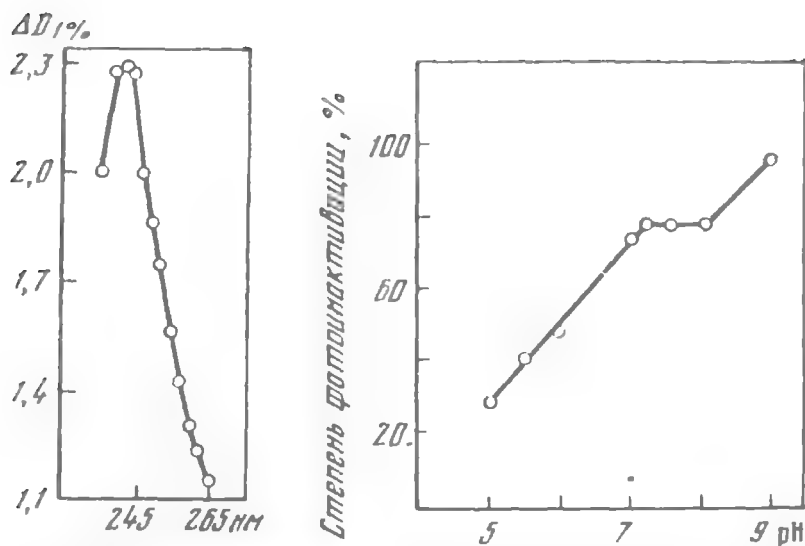


Рис. 15. Дифференциальный спектр фотооблученной транскетолазы [22]

Степень фотонактивации — 50%

Рис. 16. Влияние pH на степень фотонактивации транскетолазы [22]

хорошие результаты при исследовании глицеральдегид-фосфатдегидрогеназы [159, 160] и фосфоглюконатдегидрогеназы [417].

### *Зависимость скорости фотонактивации транскетолазы от pH среды*

Как уже указывалось, скорость фотонактивации транскетолазы при pH 7,6 и в мягких условиях проведения эксперимента относительно высокая. На том же уровне она остается и при смещении pH на половину единицы как в ту, так и в другую сторону. При переходе в область низких значений pH скорость фотонактивации существенно снижается (рис. 16). Аналогичный тип кривой (в области pH 8 и ниже) обычно получают при исследовании зависимости скорости фотоокисления свободного гистидина от pH в модельных системах [87, 479, 480, 539, 543]. Зависимость эта характерна и может служить достаточно надежным критерием для идентификации важных в функциональном отношении остатков гистидина, входящих в состав молекулы фермента. Такое

заключение неоднократно подтверждалось в литературе [3, 122, 157, 342, 417, 543].

Сложнее обстояло дело с интерпретацией правой части кривой, изображенной на рис. 16 (данные, полученные при рН выше 8). Во-первых, судя по литературным данным, ни для одной из исследованных аминокислот не было получено такой сложной зависимости скорости ее фотоокисления от рН среды. Во-вторых, ни одному из исследованных ферментов не было свойственно такое резкое увеличение скорости его фотоинактивации при рН выше 8. Поэтому можно было думать, что отмеченный выше характер кривой зависимости скорости фотоинактивации транскетолазы от рН специфичен для данного фермента или снижение ферментативной активности при фотооблучении транскетолазы (во всяком случае — при рН выше 8,0) обусловлено разрушением более чем одного типа функциональных групп фермента.

Фотоокисление свободных аминокислот в модельных системах исследовали многие авторы. Опыты ставили обычно в достаточно жестких условиях, и кроме того, методы, которые использовали для количественного определения аминокислот, не всегда были совершенны. Учитывая все это, мы изучили зависимость фотоокисления свободных аминокислот от рН в тех же условиях, в которых проводили фотооблучение транскетолазы. Их количественное содержание находили с помощью анализатора аминокислот [23].

Характер влияния рН на скорость фотоокисления триптофана оказался по существу таким же, каким он был и раньше у других авторов.

Кривая зависимости скорости фотоокисления тирозина (рис. 17, а) отличалась от полученной ранее [539], но повторяла кривую ионизации фенольной группы [87]. Последнее является подтверждением того, что фотоокисляется только ионизированное фенольное кольцо.

Зависимость скорости фотоокисления свободного гистидина от рН среды (см. рис. 17, б) оказалась по существу такой же, как и зависимость от рН скорости фотоинактивации транскетолазы (см. рис. 16). Наблюдалось увеличение скорости процесса с повышением рН до 7,0, затем ее стабилизация в диапазоне рН примерно от 7 до 8,5 и повторное увеличение при рН выше 8,5. Подобное увеличение скорости фотоокисления гистидина

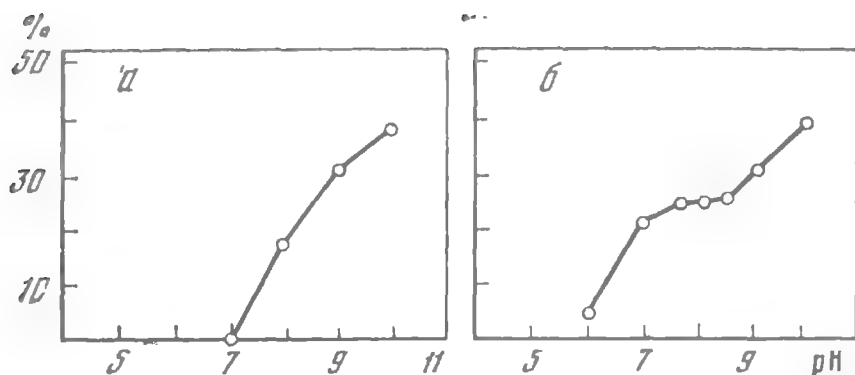


Рис. 17. Влияние pH на степень фотоокисления тирозина (а) и гистидина (б) в модельной системе [23]

По оси ординат — степень фотоокисления аминокислоты, % от ее исходного содержания

при высоких значениях pH одновременно с нами обнаружили Беллин и Джанкус [87]. Скорость фотоокисления авторы измеряли полярографически по количеству потребленного кислорода.

При фотооблучении разрушается только непротонированная форма имидазольного кольца гистидина. В соответствии с этим увеличение скорости процесса фотоокисления данной аминокислоты в кислой среде с повышением pH (левая часть кривой на рис. 17, б) обусловлено депротонизацией атома азота, стоящего в третьем положении имидазольного кольца — его  $pK_a$  равен 6 [83, 111]. Скорость фотоокисления свободного имидазола в щелочной среде (при pH выше 9) сохраняется неизменной [23] (кривая в данном случае несколько сдвинута в правую сторону по сравнению с кривой фотоокисления гистидина, что обусловлено различными значениями  $pK_{aN_3}$  — для имидазола оно равно 7 [83, 121, 164]). Поэтому увеличение скорости фотоокисления свободного гистидина в тех же условиях (правая часть кривой на рис. 17, б), очевидно, связано с повышением реакционной способности его имидазольного кольца, вызванным депротонизацией аминогруппы боковой цепи — ее  $pK_a$  равен 9,2 [74, 111, 121].

Однако свободной аминогруппы боковой цепи гистидина, естественно, в молекуле транскетолазы нет, тем не менее скорость фотонинактивации фермента (см. рис. 16) резко увеличивается в щелочной среде, точно так же, как

и скорость фотоокисления свободного гистидина (см. рис. 17, б). Можно думать, что такая кривая зависимости скорости фотоинактивации от рН среды обусловлена наличием в белковой молекуле группы, характеризующейся таким же значением  $pK_n$ , что и для свободной аминокислотной боковой цепи гистидина, близко расположенной от фотоокисляющегося имидазольного остатка и влияющей на его реакционную способность.

Существует и другая возможность объяснения повышенной скорости фотоинактивации транскетолазы в щелочной среде — разрушение наряду с остатками гистидина также и остатков тирозина. Однако такая возможность нам кажется менее вероятной. И не потому, что фотоокисление свободного тирозина начинается при более низких значениях рН, чем увеличение скорости фотоинактивации фермента (сравни рис. 17, а и рис. 16). Объяснить такое различие нетрудно. Более веским аргументом в данном случае нам кажутся результаты опытов, полученные при исследовании фотоинактивации транскетолазы при разной температуре [24].

Оказалось, что степень фотоинактивации транскетолазы существенно зависит от температуры, при которой проводится фотооблучение. При 2° она ниже, чем при 22°. При этом снижение степени фотоинактивации значительно сильнее выражено при рН 7,5, когда фотоокисляется гистидин и практически не разрушается тирозин, чем при рН 9,0, когда способны фотоокисляться и тот и другой (соответствующие величины равны 47 и 16%).

В то же время известно, что из всех аминокислот, способных фотоокисляться, сильнее всего температурная зависимость проявляется у тирозина. В том же температурном интервале, что и в опытах с транскетолазой, степень его фотоокисления уменьшается в 5 раз, а гистидина — только наполовину [541]. Считается, что аналогичная температурная зависимость сохраняется и для аминокислот, входящих в состав белковой молекулы [169, 542].

Таким образом, приведенные экспериментальные данные противоречат предположению о том, что повышение скорости фотоинактивации транскетолазы при высоких значениях рН обусловлено фотоокислением наряду с остатками гистидина также и остатков тирозина.

## РОЛЬ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП ТРАНСКЕТОЛАЗЫ, РАЗРУШАЮЩИХСЯ ПРИ ЕЕ ФОТОИНАКТИВАЦИИ

Функциональные группы транскетолазы, фотоокисление которых приводит к инаktivации фермента, могут выполнять двойную функцию: входить в состав активного центра или обеспечивать образование и поддержание нативной структуры фермента.

Из двух указанных возможностей предпочтение следует отдать первой. И вот почему. Как уже говорилось выше, фотоинаktivация транскетолазы идет без образования частично инаktivированных форм фермента. Фотоокисление одного остатка (или нескольких однотипных) приводит к полной потере ферментативной активности. Поэтому вероятнее всего он входит в состав активного центра транскетолазы. В пользу этого говорят и последующие экспериментальные данные, к рассмотрению которых мы сейчас переходим.

### *Фотоинаktivация апотранскетолазы в присутствии субстратов*

Как следует из данных табл. 5, смесь фосфопентоз, которая обычно используется в качестве субстрата при измерении транскетолазной активности, несколько снижает степень фотоинаktivации транскетолазы. Эффект выражен слабо, несмотря на то, что концентрация фосфопеп-

Таблица 5

*Фотоинаktivация транскетолазы в присутствии различных добавок [16]*

| Добавлено в фотооблучаемую пробу | Концентрация, $\times 10^{-2}$ М | Степень фотоинаktivации, % от исходной активности * | Снижение степени фотоинаktivации по сравнению с пробой без добавок, % |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| —                                | —                                | 78                                                  | —                                                                     |
| Смесь фосфопентоз                | 1,3                              | 70                                                  | 10                                                                    |
| Рибозо-5-фосфат                  | 7,0                              | 55                                                  | 30                                                                    |
| Фруктозо-6-фосфат                | 7,0                              | 57                                                  | 28                                                                    |
| Фосфат                           | 7,0                              | 56                                                  | 28                                                                    |

\* Время фотооблучения — 30 мин; pH 7,6.

тоз — насыщающая для данного фермента. При повышении концентрации и использовании индивидуальных субстратов транскетолазы (рибозо-5-фосфата и фруктозо-6-фосфата) степень фотоинактивации транскетолазы снижается в несколько большей степени (см. табл. 5).

Заметим, что фосфат, взятый в той же концентрации, что и субстраты ( $7 \cdot 10^{-2}$  М), вызывает снижение степени фотоинактивации фермента примерно на те же 30% (см. табл. 5). Влияние ионной силы в данном случае исключается, что было показано в специальных опытах [24]. Не происходило и обесцвечивания метилсенового синего, как это наблюдалось при добавлении в фотооблучаемые пробы 2 М хлористого калия [24]. Снижение степени фотоинактивации транскетолазы в рассматриваемых опытах было обусловлено наличием в среде ионов фосфата.

### *Влияние тиаминпирофосфата на фотоинактивацию транскетолазы*

Свежевыделенные препараты транскетолазы в том случае, если фракционирование сульфатом аммония проводили при относительно низких значениях рН, показывают максимальную активность без добавления извне свободных кофакторов. Они не содержат апофермента. При хранении, а также при использовании для фракционирования щелочных растворов сульфата аммония количественное содержание холофермента в препаратах уменьшалось и составляло от 15 до 80%. Препараты, полученные обоими способами, использовали в настоящих экспериментах. Относительное содержание транскетолазы определяли по величине ферментативной активности, измеренной без добавления кофакторов, и относили ее к активности, измеряемой с добавлением тиаминпирофосфата и магния. Используя аналогичный принцип расчета, относительное содержание апофермента определяли по разности между активностями, измеренными с добавлением свободных кофакторов и без них.

В первой серии опытов фотооблучение осуществляли при рН 7,6—условии максимальной стабильности фермента. Как следует из данных, представленных на рис. 18 (кривые 1), скорость фотоинактивации транскетолазы в значительной степени зависит от содержания апофермента в исходном препарате: чем его больше, тем выше ско-



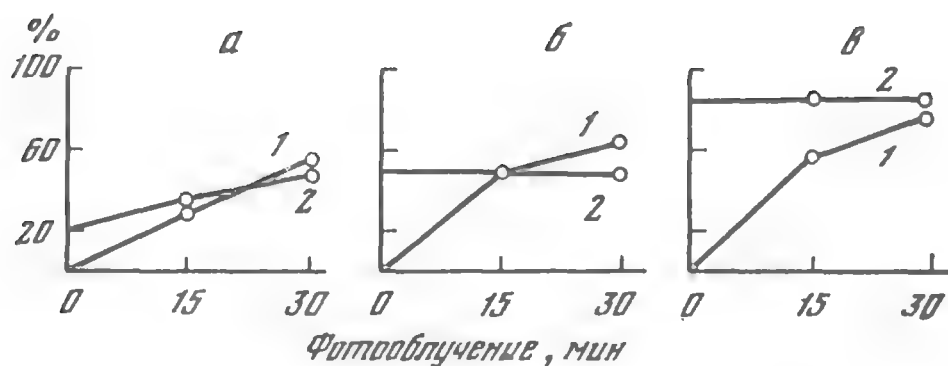


Рис. 18. Фотоинактивация препаратов транскетолазы, содержавших различное количество апофермента [22]

Опыты ставили при pH 7,6. Относительное содержание апофермента в исходных препаратах транскетолазы (в %): а — 20; б — 50; в — 85;

1 — степень фотоинактивации; 2 — относительное содержание апотранскетолазы в контрольных пробах (фермент в темноте с метиленовым синим и на свету без метиленового синего) в процессе проведения эксперимента. По оси ординат — степень фотоинактивации, % от исходной активности (опытные пробы) и содержание апофермента в контрольных пробах (в %)

рость снижения ферментативной активности. Создавалось впечатление, что снижение транскетолазной активности связано с восприимчивостью к фотооблучению только (или, по крайней мере, преимущественно) апофермента и что наличие в транскетолазе тиаминпирофосфата (холофермент) предохраняет ее от фотоинактивации. В пользу этого говорил и тот факт, что в процессе фотооблучения процентное содержание холофермента в опытных пробах увеличивается (табл. 6).

Это естественно, если количество апофермента со временем уменьшается — он фотоинактивируется, а количество холофермента остается неизменным, так как он не подвержен действию фотооблучения. Согласуется это и с тем, что при более высоком исходном содержании апотранскетолазы в исходном ферментном препарате относительное содержание в нем холотранскетолазы увеличивается в большей степени по сравнению с препаратами, где исходное содержание апотранскетолазы было низким: в первом случае скорость фотоинактивации выше, больше разрушается (фотоинактивируется) апофермента, значит и относительное содержание холофермента увеличивается в большей степени (см. табл. 6).

Вернемся еще раз к рис. 18. Обращают на себя внимание два обстоятельства.

Таблица 6

Влияние исходной степени отщепления кофермента на фотоинактивацию транскетолазы (рН 7,6) [22]

| Время фотооблучения, мин | Содержание, % |              | Степень фотоинактивации, % от исходной активности | Содержание, % |              |
|--------------------------|---------------|--------------|---------------------------------------------------|---------------|--------------|
|                          | апофермента   | холофермента |                                                   | апофермента   | холофермента |
| Контрольные пробы        |               |              | Опытные пробы                                     |               |              |
| 0                        | 85            | 15           | 0                                                 | 85            | 15           |
| 15                       | —             | —            | 58                                                | —             | —            |
| 30                       | 85            | 15           | 78                                                | 30            | 70           |
| 0                        | 50            | 50           | 0                                                 | 50            | 50           |
| 15                       | 50            | 50           | 50                                                | 30            | 70           |
| 30                       | 50            | 50           | 64                                                | 30            | 70           |
| 0                        | 20            | 80           | 0                                                 | 20            | 80           |
| 15                       | 36            | 64           | 30                                                | —             | —            |
| 30                       | 50            | 50           | 54                                                | 10            | 90           |

1. Достаточно высокая скорость фотоинактивации ферментных препаратов с низким содержанием апофермента: в конце эксперимента она даже несколько превышает таковую для препаратов фермента со значительно более высоким исходным содержанием в них апотранскетолазы (сравни на рис. 18, а, б, в, кривые 1).

2. В конце эксперимента степень фотоинактивации транскетолазы превышает исходное (а также измеренное в конце эксперимента — в контроле) содержание в препаратах апотранскетолазы (сравни на рис. 18, а, б, кривые 1 и 2).

По первому пункту объяснение напрашивается само собой. Действительно, при низком исходном содержании апотранскетолазы в контроле (на рис. 18, а, кривая 2) происходит отщепление тиаминпирофосфата и образование апофермента. То же самое должно иметь место и в опытных пробах. Поэтому наряду с фотоокислением апотранскетолазы идет непрерывное ее новообразование из холотранскетолазы, за счет чего и поддерживается, примерно, постоянная скорость фотоинактивации (рис. 18, а, кривая 1). Если же в исходном ферментном препарате много апотранскетолазы (см. рис. 18, в), то и

скорость фотоинактивации высокая (на рис. 18, в, кривая 1); затем она, однако, существенно снижается, так как количество апофермента уменьшается (он фотоокисляется), а новообразования его из холофермента в данном случае не происходит (см. рис. 18, в, прямая 2).

Превышение степени фотоинактивации транскетолазы над количественным содержанием апофермента в контроле (см. рис. 18, а, б,) на первый взгляд свидетельствует о возможности разрушения не только апотранскетолазы, но в какой-то степени и холотранскетолазы. Оказалось, однако, что, несмотря на высокую степень фотоинактивации в этих пробах (превышающую, как только что говорилось, содержание апотранскетолазы в соответствующих контрольных пробах), в них апофермент не исчезает полностью и даже в конце эксперимента остается в достаточно высоких количествах (см. табл. 6). Предпочтительнее поэтому кажется другое объяснение, заключающееся в том, что фотооблучение, разрушая апотранскетолазу, способствует тем самым распаду холофермента на кофермент и апофермент, в результате чего скорость образования апотранскетолазы в опытных пробах выше, чем в контрольных.

Следующая серия экспериментов была поставлена по той же схеме, что и предыдущая, только при рН 6. В этих условиях за время проведения эксперимента холотранскетолаза на апо- и кофермент не распадалась (табл. 7, контрольные пробы).

При использовании ферментных препаратов с различным содержанием в них апотранскетолазы (соответственно 85 и 40%) результаты оказались по существу аналогичные тем, что и при рН 7,6, только более однозначные. Наблюдалась ясно выраженная зависимость скорости фотоинактивации от количественного содержания апотранскетолазы в исходных препаратах. Степень же фотоинактивации по отношению к исходному количеству апотранскетолазы в том и другом случае была одна и та же (см. табл. 7). В полном соответствии с фотоинактивацией апофермента происходило увеличение относительного содержания холофермента в опытных пробах.

Каталитическая активность препаратов холотранскетолазы (апофермента в них содержалось менее 5%) в аналогичных условиях фотооблучения не менялась.

Таблица 7

Влияние исходной степени отщепления кофермента на фотоинактивацию транскетолазы (рН 6,0) [22]

| Время<br>фотооблу-<br>чения,<br>мин | Содержание, %    |                   | Степень<br>фотоннак-<br>тивации,<br>% от ис-<br>ходной ак-<br>тивности | Содержание, %    |                   | Степень<br>фотоннак-<br>тивации,<br>% от ис-<br>ходного<br>содержа-<br>ния апо-<br>фермента |
|-------------------------------------|------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                     | апофер-<br>мента | холофер-<br>мента |                                                                        | апофер-<br>мента | холофер-<br>мента |                                                                                             |
| Контрольные пробы                   |                  |                   | Опытные пробы                                                          |                  |                   |                                                                                             |
| 0                                   | 85               | 15                | 0                                                                      | 85               | 15                | 0                                                                                           |
| 30                                  | 85               | 15                | 48                                                                     | 70               | 30                | 58                                                                                          |
| 0                                   | 40               | 60                | 0                                                                      | 40               | 60                | 0                                                                                           |
| 30                                  | 40               | 60                | 22                                                                     | 20               | 80                | 59                                                                                          |
| 0                                   | 5                | 95                | 0                                                                      | 5                | 95                | 0                                                                                           |
| 15                                  | 5                | 95                | 0                                                                      | 5                | 95                | 0                                                                                           |

Подводя итоги изучения материала, полученного при исследовании процесса фотоинактивации препаратов транскетолазы с различным содержанием в них холофермента, можно сказать, что функциональные группы (гистидин, судя по экспериментальным данным), разрушающиеся при фотоинактивации транскетолазы, входят в состав активного центра, участвуя, по-видимому, во взаимодействии апофермента с тиаминопирофосфатом.

Теперь коснемся влияния субстратов на процесс фотоинактивации транскетолазы, о чем говорилось в начале настоящего раздела. Оно, по всей вероятности, неспецифическое. Аргументы в пользу этого следующие.

Во-первых, при высокой (в несколько раз превышающей насыщающую) концентрации субстратов эффект защиты транскетолазы от фотоинактивации выражен крайне слабо (см. табл. 5). Во-вторых, при одной и той же концентрации фруктозо-6-фосфата и рибозо-5-фосфата в среде степень фотоинактивации снижается на одну и ту же величину. В то же время сродство их к ферменту неодинаково [134]; различны и их функции — один является субстратом-донором, а второй — субстратом-акцептором. И, наконец, точно такое же влияние, что и специфические субстраты транскетолазы, оказывает обычный фосфат (см. табл. 5).

Как будет показано ниже, оба фосфатных остатка тиаминпирофосфата необходимы для образования стабильной холотранскетолазы, а свободный фосфат конкурирует с коферментом за участок связывания на апоферменте. Можно поэтому полагать, что при высокой концентрации субстраты (как и свободный фосфат) предохраняют транскетолазу от фотоинактивации, взаимодействуя неспецифически своим фосфатным остатком с функциональными группами активного центра, которые разрушаются при фотооблучении апофермента и которые специфически способны взаимодействовать с тиаминпирофосфатом.

Отсюда следует еще одно важное заключение о том, что функциональные группы, разрушающиеся при фотооблучении апотранскетолазы и специфически предохраняемые от разрушения тиаминпирофосфатом, в холотранскетолазе связаны, по-видимому, с одной из фосфатных групп кофермента.

Подобные данные о вхождении остатка гистидина в состав активного центра и его участии в связывании тиаминпирофосфата были получены и для пируватдекарбоксилазы, изолированной из пируватдегидрогеназного комплекса грудной мышцы голубя [67]. Только в данном случае в качестве сенситизатора при фотооблучении вместо метиленового синего использовали бенгальский розовый. Полученные результаты были затем подтверждены в опытах, в которых в качестве модификатора остатков гистидина в ферменте использовали диэтилпирокарбонат [54]. Экспериментальные данные, полученные с пируватдекарбоксилазой, выделенной из дрожжей, указывают на наличие остатка (или остатков) гистидина в активном центре и этого фермента [60].

## Глава шестая

# КОФАКТОРЫ

### ПРОЧНОСТЬ СВЯЗИ ТИАМИНПИРОФОСФАТА С БЕЛКОМ

Прочность связи тиаминпирофосфата с белком у разных ферментов неодинакова. По этому признаку все тиаминовые ферменты можно разделить на четыре основные группы.

1. Связь кофермента с белком очень непрочная и уже в бесклеточном экстракте фермент находится в частично разобщенном состоянии. К этой группе относятся транскетолаза *E. coli* [499], ацетинообразующий фермент из *Streptococcus faecalis* [146], ацетолактатсинтетаза *E. coli* [324], пируватоксидаза *Proteus vulgaris* [493].

2. Кофермент полностью отщепляется в процессе выделения и очистки фермента: фосфокетолаза *Lactobacillus plantarum* [209], оксоглутаратдекарбоксилаза *Mycobacterium phlei* [557], пируватдекарбоксилаза зародышей пшеницы [478], пируватдегидрогеназные комплексы из *E. coli* [298], дрожжей *Hansenula miso* [226], сердца свиньи [204, 208, 269, 293, 294, 548], мозга быка [48], грудной мышцы голубя [55, 56], пируватоксидаза из *Lactobacillus Delbrueckii* [196].

3. Тиаминпирофосфат частично отщепляется в процессе выделения и очистки фермента: транскетолаза пивных [378] и лекарственных [18, 193] дрожжей, пируватдекарбоксилаза пивных дрожжей [516], фосфокетолаза *Acetobacter xylinum* [451], оксоглутаратдегидрогеназные комплексы из пекарских дрожжей [225, 236] и сердца свиньи [227, 293].

4. Фермент выделяется в виде холоэнзима: транскетолаза шпината [248, 250], печени крыс [249, 499] и свиньи [476], из эритроцитов человека [217, 218], пируватдегидрогеназный комплекс из мозга свиньи [475], оксоглутаратдегидрогеназный комплекс грудной мышцы голубя [9].

Такое деление на группы в достаточной мере условно, однако крайние состояния разграничены довольно отчетливо. Трудно усмотреть какую-либо ясно выраженную закономерность в таком распределении по группам ферментов, выделенных из разных источников и катализирующих различные превращения разнообразных субстратов, тем не менее некоторые суждения сделать логично. Так, в первой группе нет ферментов высших организмов, и наоборот, в четвертой отсутствуют ферменты, выделенные из микроорганизмов. Оксоглутаратдегидрогеназные комплексы животных тканей достаточно стабильны, в то время как от пироватдегидрогеназных комплексов, полученных из тех же источников, кофермент отщепляется достаточно легко (исключение составляет только пироватдегидрогеназный комплекс из мозга свиньи), хотя оба близки по свойствам и катализируют один и тот же тип реакции — окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетокислот. Прочность связи тиаминпирофосфата в транскетолазе варьирует в очень широких пределах: от очень лабильной в ферменте из *E. coli* до очень стабильной в ферментах печени свиньи и эритроцитов человека.

Кофермент, не отщепившийся в процессе выделения фермента, можно отщепить одним из следующих способов: воздействие (переосаждение или диализ) щелочным раствором сульфата аммония [78, 179, 180, 193, 527], переосаждение или диализ при pH 4,5—6,5 [182, 246, 250, 392, 494], диализ против раствора ЭДТА [123, 339]. В некоторых случаях апофермент получали уже при диализе против глицил-глицинового буфера, pH 7,6 [378], или даже против воды [272].

Высокоочищенная транскетолаза из печени свиньи не требует для проявления максимальной ферментативной активности добавления извне тиаминпирофосфата [476]. Потребность в коферменте не могла быть показана даже после диализа против 0,6%-ного раствора ЭДТА, проводившегося в течение 5 дней (условия для полного отщепления тиаминпирофосфата от транскетолазы дрожжей). Так же прочно связан кофермент и с транскетолазой, выделенной из эритроцитов человека [217].

Попытка отщепить тиаминпирофосфат от транскетолазы печени свиньи обработкой фермента сульфатом аммония в кислой среде, как это было сделано с транскетолазой листьев шпината и печени крыс [250], сопровож-

далась полной денатурацией фермента [476]. При попытке отщепить кофакторы от пируватдегидрогеназного комплекса мозга свиньи также происходила почти полная потеря энзиматической активности [475]. Интересно заметить, что тот же фермент и тоже из мозговой ткани (только в данном случае — быка) полностью терял кофермент без всяких воздействий уже при нейтральных значениях pH [48].

Могут быть по меньшей мере две возможности для объяснения указанных экспериментальных данных. Либо кофермент прочно связан с белком (возможно, ковалентно) и не удаляется при использовании обычных методов, либо он отщепляется, но образующийся апофермент настолько лабилен, что тут же денатурирует, а так как степень отщепления определялась по разности активности, измеряемой с добавленными извне кофакторами и без них, то и создавалось впечатление, что кофермент не отщепляется.

В пользу второй возможности указывает то, что при условиях, когда тиаминпирофосфат отщепляется от других ферментов без существенного нарушения их нативной структуры, транскетолаза печени и пируватдегидрогеназный комплекс мозга свиньи денатурируют. Об этом же свидетельствуют и результаты, полученные с пируватдекарбоксилазой пекарских дрожжей [177]. Этот фермент частично диссоциирует на субъединицы уже при нейтральном значении pH. Одновременно происходит и отщепление тиаминпирофосфата. Оба процесса ускоряются при смещении pH в щелочную сторону и замене фосфатного буфера на *трис*-HCl буфер. Отщепление кофермента и диссоциация на субъединицы обратимы, и в фосфатном буфере при низких значениях происходит реконструкция холофермента с восстановлением его исходных структурных и каталитических характеристик. Холофермент достаточно стабилен и не теряет активность в течение длительного времени. При отщеплении тиаминпирофосфата и распаде на субъединицы стабильность снижается, и через несколько часов нельзя ни восстановить активность, ни реассоциировать фермент из его субъединиц. Именно такой случай возможен для двух вышеуказанных ферментов — транскетолазы, выделенной из печени свиньи, и пируватдекарбоксилазы пируватдегидрогеназного комплекса мозга свиньи.



## ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПРОЧНОСТЬ СВЯЗИ ТИАМИНПИРОФОСФАТА С ТРАНСКЕТОЛАЗОЙ

С апотранскетолазой пекарских дрожжей кофермент связан относительно непрочной и частично отщепляется от нее уже в процессе выделения и очистки фермента. При хранении препаратов транскетолазы в виде суспензии кристаллов в растворе сульфата аммония 50%-ной степени насыщения наблюдается дальнейшее высвобождение тиаминпирофосфата. Процесс этот, однако, медленный, и для перехода всего количества холофермента в апофермент обычно требуется длительное время.

Для принудительного отщепления тиаминпирофосфата от холотранскетолазы пекарских дрожжей в лаборатории Рекара были разработаны три метода: переосаждение ферментного препарата из щелочного раствора сульфата аммония; 20-часовой диализ против 1000-кратного объема 0,6%-ного раствора ЭДТА в  $2 \cdot 10^{-2}$  М калий-фосфатном буфере, pH 7,4, с последующим 20-часовым диализом против того же объема ЭДТА, но приготовленного на 0,9%-ном хлористом калии [396] и 48-часовой диализ против 1,6 М раствора сульфата аммония, pH 7,8 [134].

Оказалось, однако, что эффективен только второй способ — диализ против раствора ЭДТА. При переосаждении из щелочного раствора сульфата аммония кофермент также отщепляется, но даже после 4—5 переосаждений в препаратах еще оставалось до 20% холофермента. Кроме того, происходило значительное снижение ферментативной активности (имеется в виду общая активность, определяемая в оптимальных условиях при насыщающей концентрации кофакторов) [18].

По существу аналогичные результаты были получены и при диализе против щелочного раствора сульфата аммония — неполное отщепление тиаминпирофосфата и потеря ферментативной активности. Как оказалось впоследствии, диализ сам по себе ничего не дает и его замена простым выдерживанием при той же концентрации сульфата аммония приводит к аналогичной степени отщепления кофермента, причем каталитическая активность ферментных препаратов сохранялась на исходном уровне [18].

Выдерживание препаратов транскетолазы в 1,6 М растворе сульфата аммония, pH 7,8, в течение 48 ч при

концентрации белка 10 мг/мл сопровождалось частичным отщеплением кофермента. При тех же условиях, но при рН 8,5, оно уже было полным. Снижение исходной концентрации белка в два раза сопровождалось полным отщеплением тиаминпирофосфата и при рН 7,8. При концентрации 1 мг/мл полный переход холофермента в апофермент осуществлялся уже за 24 ч. При рН 6,8 кофермент практически не отщеплялся и изменение концентрации ферментного препарата в исследуемых пробах существенно не влияло на результаты опыта [18].

Степень и скорость отщепления кофермента находятся в прямой зависимости от концентрации раствора сульфата аммония, в котором проводили выдерживание транскетолазы. При его концентрации, равной 1,33 М, уже через 5 ч холотранскетолаза в препаратах не обнаруживалась. В растворах сульфата аммония с более низкой концентрацией снижались как скорость, так и степень отщепления тиаминпирофосфата. Более того, полного перехода холотранскетолазы в апотранскетолазу не удавалось наблюдать ни при одной из исследованных концентраций сульфата аммония ниже 1,30 М (табл. 8).

Ранее было известно ингибирующее действие ионов сульфата на транскетолазную активность [134]. Можно было поэтому предполагать о наличии конкурентных взаимоотношений между коферментом и указанными анионами и в этом видеть причину влияния сульфата аммония на процесс отщепления тиаминпирофосфата от холотранскетолазы.

Последнее, однако, не подтвердилось в эксперименте: в 1,3 М растворе сернокислого аммония кофермент отщеплялся быстро и полностью, а в 1,3 М растворе сернокислого лития — медленно и далеко не полностью (см. табл. 8), несмотря на то, что концентрация сульфатных ионов в обоих случаях была одинакова. Из этих же опытов следует, что и величина ионной силы существенного влияния на отщепление кофермента не оказывает (в приведенных опытах — резко различных по результатам — она была одинакова).

Оставалось предположить специфическое влияние ионов аммония, входящих в состав  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Это становится очевидным, если опять обратиться к результатам, приведенным в табл. 8. При одной и той же концентрации ионов аммония (1,3 М сульфат аммония и 2,6 М хлористый

Таблица 8

Отщепление тиаминпирофосфата от транскетолазы  
при ее выдерживании в растворах различных солей [18]  
(концентрация белка — 1 мг/мл; рН 8,5)

| Соль                         | Концен-<br>трация,<br>М | Содержание холотранскетолазы, % от исходного |     |     |     |     |     |     |
|------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                              |                         | 0 ч                                          | 1 ч | 2 ч | 3 ч | 4 ч | 5 ч | 6 ч |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | $1,8 \cdot 10^{-1}$     | 100                                          | 90  | 80  | 80  | 80  | 80  | —   |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | $3,5 \cdot 10^{-1}$     | 100                                          | 80  | 60  | 50  | 50  | 50  | —   |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | $7,0 \cdot 10^{-1}$     | 100                                          | 50  | 30  | 30  | 30  | 30  | —   |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 1,3                     | 100                                          | 48  | 30  | 25  | 10  | 5   | 0   |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 1,33                    | 100                                          | 50  | 30  | 25  | 10  | 0   | —   |
| $\text{NH}_4\text{Cl}$       | 2,6                     | 100                                          | 50  | 20  | 15  | 5   | 0   | —   |
| $\text{NH}_4\text{Cl}$       | 4,0                     | 100                                          | 25  | 6   | 0   | —   | —   | —   |
| $\text{Li}_2\text{SO}_4$     | 1,3                     | 100                                          | 80  | 80  | —   | —   | —   | —   |

аммоний) наблюдается полное отщепление тиаминпирофосфата. Примерно одинакова и скорость процесса отщепления. Если концентрация ионов аммония увеличивается (4 М хлористый аммоний), то и скорость процесса повышается.

Таким образом, для отщепления тиаминпирофосфата от холотранскетолазы оптимальными являются следующие условия [18]: концентрация сульфата аммония в среде — 1,33 М (при более высокой — фермент может частично выпадать в осадок); концентрация белка — 1 мг/мл (при более низкой — фермент менее стабилен и не полностью выпадает в осадок при последующем высаливании сульфатом аммония для хранения и использования в работе); рН — 8,5 (при более высоких значениях рН фермент менее стабилен).

Возможно, причиной того, что, используя методы Рескера и сотр. (пересаживание сульфатом аммония и диализ против раствора сульфата аммония), полного отщепления тиаминпирофосфата не удавалось получить, являлась высокая концентрация белка в растворе фермента (авторы этот пункт в своих методиках никак не оговаривают). Интересно заметить, что в лаборатории Томи-та, где работают с транскетолазой пивных дрожжей, выделяемой по той же методике, что и транскетолазу пекарских дрожжей, также теперь не пользуются для

отщепления тиаминпирофосфата методиками Рекера и сотр., а используют способ [378], в принципе аналогичный предложенному нами.

К вопросу о влиянии ионов аммония на процесс отщепления кофермента мы еще вернемся при дальнейшем изложении.

## СТАБИЛИЗИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ТИАМИНПИРОФОСФАТА

### *Стабилизация транскетолазы пекарских дрожжей*

*В условиях тепловой денатурации.* Выдерживание апотранскетолазы в растворе трис-буфера, рН 7,6, при 45° сопровождалось ясно выраженным снижением ферментативной активности: примерно на 50% — после часа инкубации и более чем на 60% — через два часа инкубации. При добавлении в инкубируемые пробы тиаминпирофосфата степень инактивации фермента заметно снижалась. Ощутимый эффект наблюдался уже при концентрации кофермента, равной  $1,6 \cdot 10^{-5}$  М. Он усиливался при повышении содержания тиаминпирофосфата в пробе, и при его концентрации  $4 \cdot 10^{-4}$  М (это та концентрация кофермента, которая при изменении транскетолазной активности является насыщающей) ферментативная активность сохранялась практически неизменной, лишь незначительно снижаясь ко второму часу инкубации [2]<sup>1</sup>.

*В условиях кислотной денатурации.* Как следует из данных, представленных в табл. 9, в условиях кислотной денатурации (инкубация фермента при рН 4,4 и комнатной температуре) происходит резкое снижение транскетолазной активности апофермента — через 15 мин остается лишь около 40% исходной ее величины. Холофермент при этих же условиях и за это же время выдерживания инактивируется менее чем на 10%. Активность апо- и холотранскетолазы в контроле — инкубация при рН 7,6 — сохраняется на исходном уровне.

Судя по оптическим свойствам, изученным в далекой ультрафиолетовой области спектра, общая исходная (до кислотной денатурации) структура апо- и холофермента

<sup>1</sup> Стабилизирующий эффект тиаминпирофосфата наблюдали и при тепловой инактивации декарбоксилазного компонента оксоголутаратдегидрогеназного комплекса из мозга быка [59].

Таблица 9

Стабильность транскетолазы в условиях кислотной денатурации [2]

Выдерживание транскетолазы ( $2,6 \cdot 10^{-6}$  М) в  $5 \cdot 10^{-2}$  М ацетатном буфере, рН 4,4, при комнатной температуре

| Время выдерживания,<br>мин | Степень инактивации*, % от исходной активности** |             |
|----------------------------|--------------------------------------------------|-------------|
|                            | апофермент                                       | холофермент |
| 3                          | 35                                               | 5           |
| 8                          | 47                                               | 8           |
| 15                         | 58                                               | 9           |

\* Активность в контроле (выдерживание апо- и холотранскетолазы в  $5 \cdot 10^{-2}$  М трис-буфере, рН 7,6) оставалась неизменной в течение всего времени проведения эксперимента.

\*\* Величину ферментативной активности во всех случаях определяли при рН 7,6 в присутствии кофакторов, взятых в насыщающих концентрациях.

одинакова — кривые дисперсии оптического вращения и циркулярного дихроизма в обоих случаях по существу идентичны. Другими словами, не было найдено различий в содержании упорядоченных структур. Различия, однако, появлялись при кислотной денатурации. Выражалось это в следующем.

В исходном состоянии (рН близкий к нейтральному) оптическое вращение во впадине кривой дисперсии оптического вращения ( $[m']_{233}$ ) и для апо- и для холотранскетолазы было одинаковым и составляло величину порядка  $-4000^\circ$ . В результате кислотной денатурации (через 15 мин выдерживания при рН 4,4 — при этих условиях активность апотранскетолазы снижалась примерно на 60% — см. табл. 9) оно изменялось в значительно большей степени в случае апофермента по сравнению с холоферментом — соответственно до  $-3300^\circ$  и  $-3700^\circ$ . Существенно, что при последующей ренатурации оптическое вращение апофермента продолжало изменяться в том же направлении, а кривая дисперсии оптического вращения холофермента приобретала вид, близкий к первоначальному (до денатурации). Следовательно, в холотранскетолазе по сравнению с апотранскетолазой изменения общей структуры белковой молекулы при кислотной денатурации выражены, во-первых, в меньшей степени и, во-вторых, указанные изменения практически полностью обратимы.

Эти данные хорошо согласуются с результатами инактивации транскетолазы в процессе кислотной денатурации (см. табл. 9): при однотипных условиях апофермент инактивируется больше чем наполовину, а холофермент — лишь в слабой степени.

Итак, тиаминпирофосфат стабилизирует молекулу транскетолазы в условиях тепловой и кислотной денатурации, при этом общая структура апо- и холофермента до денатурации практически не различается. В настоящее время можно, по-видимому, считать общепризнанным представление, согласно которому молекулы фермента в растворе присутствуют в нескольких равновесных конформационных состояниях [73, 326]. Другими словами, предполагается высокая степень лабильности белковой структуры, причем не всей, а только небольшой ее части, а точнее — поверхности белковой глобулы. Поэтому стабилизацию апофермента кофакторами или субстратами и перевод его из «рыхлой» формы в более «компактную», на что неоднократно указывалось в литературе [109, 466, 467, 496, 498, 519, 534], можно себе представить таким образом, что кофакторы (или субстрат) взаимодействуют не со всеми молекулами фермента, а только с теми из них, которые находятся в определенном конформационном состоянии. Результатом будет перевод всего фермента (или какой-то, очевидно большей, его части) в эту форму и как следствие — его стабилизация. Подчеркнем еще раз, что при всех этих взаимопревращениях общая структура фермента (количественное содержание упорядоченных структур) будет оставаться неизменной.

Отмеченную выше стабилизацию транскетолазы тиаминпирофосфатом мы склонны объяснять именно с точки зрения конформационной лабильности белковой молекулы фермента, о которой только что говорилось.

#### ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ В КАЧЕСТВЕ АКТИВАТОРОВ

Транскетолаза после отщепления от нее тиаминпирофосфата полностью теряет свою каталитическую активность. Активность частично восстанавливалась при последующем добавлении в среду кофермента. Для прояв-

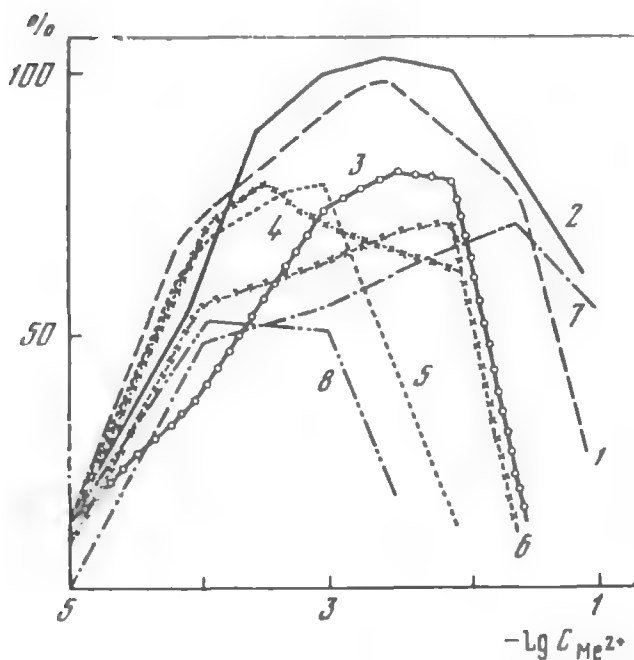


Рис. 19. Активность транскетолазы в присутствии различных катионов [29]

Концентрация тиаминпирофосфата —  $7 \cdot 10^{-5}$  М; 1 — магний; 2 — марганец; 3 — железо; 4 — цинк; 5 — никель; 6 — кобальт; 7 — кальций; 8 — кадмий. По оси ординат — ферментативная активность в % от активности в присутствии  $5 \cdot 10^{-3}$  М ионов магния

ления максимальной активности наряду с тиаминпирофосфатом необходимо было добавлять также магний. Этот катион считался кофактором транскетолазы и использовался во всех исследованиях, проводимых с данным ферментом.

Оказалось, однако, как это следует из результатов, приведенных на рис. 19, что активирующей способностью обладают и многие другие двухвалентные катионы, причем степень активации фермента со многими из них была лишь незначительно ниже, чем с магнием, а с марганцем — даже несколько выше. По степени активации, при оптимальной их концентрации в среде, металлы-активаторы располагались в таком порядке: марганец > магний > железо, никель, цинк > кальций, кобальт > кадмий, т. е. более сильное повышение активности транскетолазы вызывают катионы, которые образуют с белками комплексы наименьшей стабильности.

Концентрация ионов металлов, при которой наблюдается максимальная для данного катиона степень активации транскетолазы, для разных катионов различна. Так, для кадмия она равна примерно  $1 \cdot 10^{-4}$  М, для цинка —  $5 \cdot 10^{-4}$  М, никеля —  $1 \cdot 10^{-3}$  М, магния, марганца и железа —  $5 \cdot 10^{-3}$  М, кобальта —  $1 \cdot 10^{-2}$  М, кальция —  $5 \cdot 10^{-2}$  М.

Как правило, активирующий эффект катионов начал проявляться уже при относительно низкой их концентрации, затем он усиливался, а при достаточно высокой концентрации (не одинаковой для разных металлов) наступало ингибирование.

Простейшим объяснением такого двойственного влияния ионов двухвалентных металлов на транскетолазную активность могло бы служить наличие в ферменте двух различных участков — активационного и ингибиторного (ингибирование фермента относительно высокими концентрациями катионов возможно также и в результате неспецифического их взаимодействия с молекулой белка). Если сродство, как абсолютное, так и относительное, различных ионов металлов к этим участкам неодинаково, то неодинаковыми будут как активирующий эффект, так и диапазон концентраций катионов, в котором этот эффект обнаруживается. Различная эффективность ионов металлов как собственно активаторов и ингибиторов при этом, естественно, не исключается.

Возможность объяснения разной эффективности металлов-активаторов неодинаковым положением оптимума рН транскетолазной реакции при использовании различных катионов не подтвердилась в экспериментах, суть которых заключается в следующем [28].

Оптимум рН транскетолазной реакции лежит при 7,6. Это было показано с магнием в качестве металла-активатора [134]. Оказалось, что положение оптимума рН практически не меняется, если вместо магния использовать другие металлы-активаторы (рис. 20), но при одном условии — их концентрация в системе должна быть оптимальной, исходя из данных рис. 19. Если металл добавляли в концентрации, недостаточной для максимальной активации транскетолазы данным катионом, то оптимум рН сдвигался в кислую область. При использовании металла в ингибирующей концентрации оптимум рН сдвигался в щелочную область. Особенно отчетливо это видно на примере с цинком, но в той или иной степени



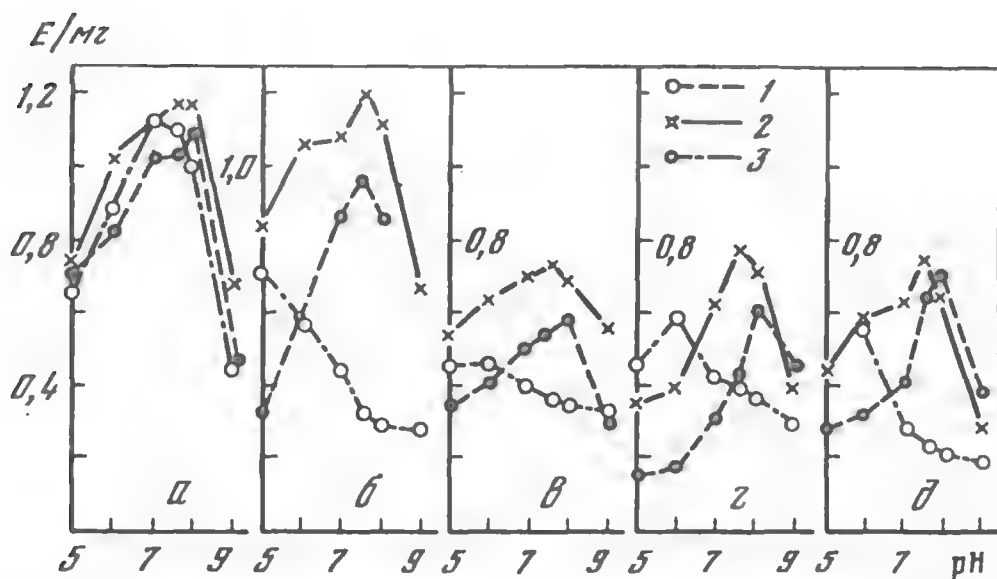


Рис. 20. Положение оптимума pH транскетолазной реакции в зависимости от природы и концентрации двухвалентных катионов [28]

Концентрация катионов (в М): а — магний: 1 —  $4,2 \cdot 10^{-5}$ , 2 —  $2,5 \cdot 10^{-3}$ , 3 —  $8,2 \cdot 10^{-2}$ ; б — марганец: 1 —  $1,5 \cdot 10^{-4}$ , 2 —  $4,2 \cdot 10^{-3}$ , 3 —  $8,3 \cdot 10^{-2}$ ; в — кальций: 1 —  $3,3 \cdot 10^{-4}$ , 2 —  $1,0 \cdot 10^{-2}$ , 3 —  $1,0 \cdot 10^{-1}$ ; г — цинк: 1 —  $2,0 \cdot 10^{-4}$ , 2 —  $1,0 \cdot 10^{-3}$ , 3 —  $5,0 \cdot 10^{-3}$ ; д — никель: 1 —  $5,0 \cdot 10^{-5}$ , 2 —  $5,0 \cdot 10^{-4}$ , 3 —  $5,0 \cdot 10^{-3}$

проявлялось и с другими исследованными катионами (см. рис. 20).

Одна и та же величина сдвига оптимума pH при сильно различающемся диапазоне концентраций различных катионов, и наоборот (сравни, например, опыты с хлористым магнием и хлористым марганцем на рис. 20), указывает на то, что влияние катионов специфическое и не связано с изменением ионной силы реакционной смеси или концентрации анионов хлора. Это же подтвердили и специальные опыты, в которых хлористый калий добавляли в среду в разной концентрации, что совершенно не сказывалось на положении оптимума pH транскетолазной реакции [28].

Для проявления максимальной активности и других тиаминовых ферментов, лишенных тиаминпирофосфата, также требовалось в большинстве случаев, кроме кофермента, добавлять ионы двухвалентных металлов [79, 193, 209, 225, 269, 324, 396]. Обычно это был магний, но и многие другие двухвалентные катионы обладали активирующей способностью. Их действие сильно различалось как

по величине абсолютного эффекта, так и по способности активировать различные ферменты. Так, пируватдегидрогеназный комплекс из сердца свиньи сильнее активировался кальцием, чем магнием. По степени активирующего действия на пируватдекарбоксилазу пекарских дрожжей металлы располагались в следующий ряд:  $Mg^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Ca^{2+} > Fe^{2+}$  [180]. То же для других ферментов: пируватоксидаза из *Proteus vulgaris*:  $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Fe^{3+}$ ,  $Ni^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  и  $Cd^{2+}$  были неактивны) [493]; оксоглутаратдекарбоксилаза из *Mycobacterium phlei*:  $Mn^{2+} > Mg^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  неактивен,  $Zn^{2+}$  — ингибитор) [557]; ацетолактатсинтетаза из *Serratia marcescens*:  $Mn^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Ba^{2+} > Zn^{2+}$  [339]; пируватдекарбоксилаза из зародышей пшеницы:  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+}$  ( $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Sr^{2+}$  — неактивны) [478].

Фенилпируватдекарбоксилазу из *Achromobacter eurydice* активирует только магний. Марганец, кобальт, никель никакого влияния на активность практически не оказывают, но будучи добавлены в систему вместе с магнием (в эквимольных концентрациях) мешают проявить ему свое активирующее действие; цинк сам по себе ингибирует фермент [78].

Разобщение фермента от тиаминпирофосфата обычно сопровождается отщеплением металла, однако металл связан с белком более прочно, и в ряде случаев требуется дополнительное воздействие для его удаления из фермента [182, 205, 396, 493].

В настоящее время трудно сказать, является ли металл обязательным компонентом для действия тиаминных ферментов или его роль ограничивается активацией. Возможно, справедливо и то, и другое, и в каждом отдельном случае характер влияния металла определяется спецификой фермента и реакции, которую он катализировать. В литературе имеются примеры, подтверждающие обе эти возможности. Так, фосфокетолаза *Acetobacter xylinum*, пируватдегидрогеназный комплекс сердца свиньи и ацетолактатсинтетаза из *Serratia marcescens* после соответствующей обработки теряют способность активироваться тиаминпирофосфатом в отсутствие добавленных катионов двухвалентных металлов [182, 339, 451]. С другой стороны, не исключается возможность

частичного проявления активности некоторых ферментов и в отсутствие металлов [361, 478].

Для интерпретации опытов с транскетолазой печени крыс, в которых показано полное восстановление активности разобщенного фермента при добавлении только кофермента [250], необходимы дополнительные, более подробные исследования. В частности — количественное определение возможного присутствия жестко связанного металла в самом белке или свободных катионов в качестве примеси в других компонентах системы. Впрочем, это же относится и ко всем остальным экспериментам, о которых говорилось выше.

Степень реактивации разобщенной транскетолазы пекарских дрожжей последующим добавлением кофакторов зависела от порядка их добавления [134]. Максимальная активность наблюдалась только в том случае, если кофакторы добавляли вместе или тиаминпирофосфат добавляли после магния. С одним тиаминпирофосфатом активность была снижена примерно наполовину, и она не повышалась при последующем добавлении металла. Кофермент, связываясь с апоферментом в отсутствие металла, не только не проявляет каталитическую активность, но мешает связаться магнию и проявить свое активирующее действие. На основании этих данных авторы полагают, что металл в транскетолазе выполняет функцию мостика между апоферментом и тиаминпирофосфатом. Аналогичные предположения высказывались и ранее, при изучении других тиаминовых ферментов [180, 493], хотя убедительных экспериментальных данных в пользу этого не приводилось.

Сведения относительно природы металла, входящего в состав тиаминовых ферментов, выделенных в нативном виде, достаточно скудны. Так, в частично очищенных препаратах пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей [179, 180] и, возможно, пируватоксидазы *Proteus vulgaris* [493] было обнаружено наличие магния. Точные количественные измерения не проводились. Более подробно в этом плане исследовали транскетолазу пекарских дрожжей [285]. В работе использовали высокоочищенный однородный препарат фермента, показывающий максимальную активность и без добавления извне кофакторов. Перед исследованием его пропускали через сефадекс G-50, уравновешенный  $1 \cdot 10^{-3}$  М калий-фосфатным буфером (рН

6,4) — условие, при котором способность кофермента отщепляться от холотранскетолазы минимальна. Элюцию осуществляли тем же буфером. Содержание металла в нем было незначительное, тем не менее его учитывали при окончательных расчетах.

Согласно предварительным спектрографическим данным, в ферментном препарате, на одной из последних стадий его очистки, обнаруживаются железо, медь, магний, кальций. Первые два, как показали последующие количественные измерения на атомном абсорбционном спектрофотометре, — в незначительном количестве, которое в процессе дальнейшей очистки фермента сохранялось на том же уровне. В высокоочищенных однородных препаратах транскетолазы их было меньше 0,2 г·атом на моль белка. Магния в неочищенных препаратах было достаточно много, но постепенно его количество уменьшалось и конечное содержание становилось примерно равным содержанию железа и меди. Больше всего обнаруживалось кальция, и конечное содержание его в высокоочищенных препаратах холотранскетолазы составляло примерно 2,4 г·атом на моль белка.

Что касается функции кальция как кофактора транскетолазы, а также участия двухвалентных катионов в формировании активного центра пируватдекарбоксилазы дрожжей, то речь об этом пойдет в последующих главах.

## Глава седьмая

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОФАКТОРОВ С ТИАМИНОВЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАЛЬЦИЯ С ТРАНСКЕТОЛАЗОЙ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ

В данных исследованиях использовали транскетолазу, содержащую около 0,3 г·атом кальция и 0,1 г·атом магния на моль белка и не содержащую тиаминпирофосфата. Апофермент преникубировали с кальцием, а также с кальцием и тиаминпирофосфатом, взятыми в насыщающих концентрациях. После преникубации пробы пропускали через сефадекс G-50 для удаления свободных кофакторов, затем определяли количественное содержание кальция и тиаминпирофосфата в ферменте. При преникубации транскетолазы с кальцием и тиаминпирофосфатом определяли, кроме того, степень реконструкции холофермента — по активности.

В результате проведенных исследований оказалось [32], что с апоферментом необратимо или, точнее, — «квази необратимо» (т. е. не отщепляясь в процессе пропускания через сефадекс) связывается около 1 г·атом кальция на моль белка. Если преникубацию транскетолазы проводили с тиаминпирофосфатом и кальцием, то последнего в реконструированном холоферменте обнаруживалось 2,3 г·атом на моль белка, т. е. примерно столько же, сколько и в нативном холоферменте, о чем говорилось выше (степень реконструкции холофермента в рассматриваемых опытах была 100%-ная).

Следовательно, второй атом кальция или совсем не взаимодействует с апотранскетолазой, или связывается, но обратимо, а кофермент обеспечивает его необратимое связывание.

Как уже указывалось выше, при хранении холотранскетолазы в щелочном растворе сульфата аммония происходит отщепление тиаминпирофосфата. Каталитиче-

ская активность ферментных препаратов при этом снижается, если ее измерять только с одним тиаминпирофосфатом. Для проявления максимальной активности требовалось добавить еще и ионы двухвалентных металлов. В таких ферментных препаратах количество кальция снижено примерно наполовину по сравнению с исходным холоферментом [285].

Таким образом, один атом кальция достаточно легко удаляется из транскетолазы после (или одновременно) отщепления кофермента. Транскетолазная активность, определяемая только с тиаминпирофосфатом, при этом снижается. Это, очевидно, тот кальций, который не связывается необратимо с апотранскетолазой и обнаруживается только в холоферменте, как в нативном, так и в реконструированном. Второй атом кальция связан с белком более прочно, и для его удаления требуется длительный диализ против раствора ЭДТА и последующее пропускание через сефадекс. Это, по-видимому, тот кальций, который необратимо связывается с апоферментом и в отсутствие тиаминпирофосфата.

## ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ КАЛЬЦИЯ

Рассмотрим результаты опытов, в которых исследовали влияние кальция, добавленного извне, на каталитическую активность апофермента, измеряемую только с тиаминпирофосфатом [286].

Как видно из данных рис. 21, добавление кальция существенно влияет на транскетолазную реакцию, увеличивая ее максимальную скорость и сродство кофермента к апоферменту. Последний эффект выражен резко — величина константы Михаэлиса уменьшается от  $3,3 \cdot 10^{-5}$  М в отсутствие металла до  $4,0 \cdot 10^{-6}$  М в присутствии  $5,0 \cdot 10^{-3}$  М кальция<sup>1</sup>.

При относительно низких концентрациях катиона ( $1,0 \cdot 10^{-4}$  М) максимальная скорость транскетолазной реакции не меняется; влияние металла сказывается лишь на величине  $K_m$  для тиаминпирофосфата. С повышением

<sup>1</sup> При добавлении в качестве активирующего катиона магния вместо кальция максимальная скорость транскетолазной реакции увеличивалась в большей степени, в то время как величина  $K_m$  для тиаминпирофосфата не изменялась [286].

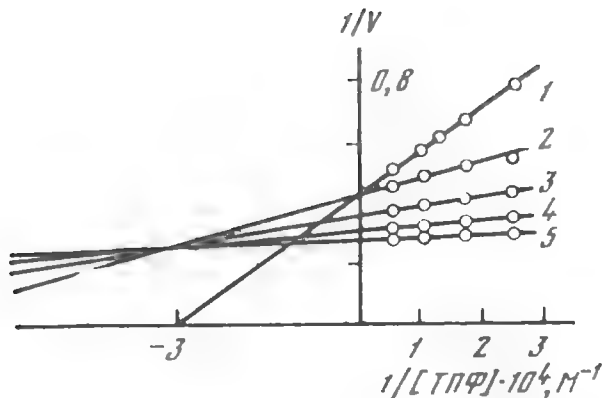


Рис. 21. Зависимость скорости транскетолазной реакции от концентрации тиаминпирофосфата при разном содержании кальция в среде [286]

1 — металл не добавляли; 2, 3, 4, 5 — добавлен кальций в концентрациях:  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  М

концентрации катиона  $K_m$  продолжает уменьшаться, и в то же время начинает увеличиваться максимальная скорость реакции.

Такой характер влияния кальция на транскетолазную реакцию позволяет думать, что в данном случае взаимодействие металла осуществляется по двум металл-связывающим участкам фермента. Это хорошо согласуется с наличием двух атомов кальция в молекуле холотранскетолазы. Присоединение кальция к одному из них сопровождается повышением сродства кофермента к апотранскетолазе: максимальная активность при этом не изменяется. Присоединение кальция к другому участку вызывает повышение максимальной скорости транскетолазной реакции, т. е. собственно активацию фермента. По-видимому, отщепление кальция именно от этого участка приводит к снижению ферментативной активности, определяемой только с тиаминпирофосфатом, о чем говорилось выше.

Приведенные данные коррелируют и в смысле различного сродства атомов кальция к ферменту. Сродство одного из них высокое, и его действие (влияние на  $K_m$ ) проявляется уже при относительно низких концентрациях (см. рис. 21). Сродство другого, влияющего на максимальную скорость транскетолазной реакции, ниже, и требуется более высокая его концентрация в среде для взаимодействия с транскетолазой и проявления активирующего действия.

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ ТИАМИНПИРОФОСФАТА, УЧАСТВУЮЩИЕ В СВЯЗЫВАНИИ КОФЕРМЕНТА АПОТРАНСКЕТОЛАЗОЙ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ

Для выяснения того, какие группы (или части молекулы) тиаминапирофосфата участвуют в его взаимодействии с апотранскетолазой, было исследовано влияние на транскетолазную активность различных аналогов кофермента после их предварительной инкубации с апоферментом в присутствии кальция и низких концентраций тиаминапирофосфата [278].

Во всех исследованных случаях наблюдалось снижение величины определяемой активности. Действие аналогов, как и следовало ожидать, было чисто конкурентным к коферменту. Такой характер ингибирования аналогами кофермента обычно указывает на то, что их связывание осуществляется в активном центре.

Самая высокая величина ингибиторной константы была получена для тиамина ( $8 \cdot 10^{-2}$  М), а самая низкая — для тиазолпирофосфата ( $2,4 \cdot 10^{-6}$  М). Тиаминофосфат занимает промежуточное положение —  $K_i = 2,7 \cdot 10^{-5}$  М. Определенная в этих же опытах константа Михаэлиса для тиаминапирофосфата составляла величину порядка  $3,0 \cdot 10^{-7}$  М [21]. Таким образом, по мере усложнения молекулы тиамина (тиамин → тиаминофосфат → тиаминапирофосфат) сродство его к апоферменту увеличивается, что указывает на участие тиаминовой части кофермента и обоих фосфатных остатков в его связывании с активным центром транскетолазы, причем основной вклад вносит пирогосфатный остаток. Это следует из сопоставления величин соответствующих констант, приведенных выше. На это же указывает и очень низкая величина ингибиторной константы для тиазолпирофосфата ( $2,4 \cdot 10^{-6}$  М). Хотя и свободный тиазол тоже способен ингибировать транскетолазу, конкурируя с коферментом за апофермент, но величина  $K_i$  для него оказалась на несколько порядков выше, чем для его пирогосфорилированного производного [21].

В данных опытах нельзя было сопоставить ингибирующее действие вышеуказанных аналогов тиаминапирофосфата с ингибирующим действием свободного пирогосфата, так как в присутствии кальция последний выпадал в осадок. В среде же без кальция ингибирование



транскетолазы пирофосфатом, конкурентное по отношению к тиаминпирофосфату, было показано. По сравнению со свободным тиазолом эффект выражен в большей степени, а по сравнению с тиазолпирофосфатом — в меньшей [21]. Заметим здесь, что точно так же, как и аналоги тиаминпирофосфата, действовал ион аммония, т. е. ингибировал транскетолазу, конкурируя с коферментом за апофермент ( $K_i = 2,8 \cdot 10^{-4}$  М). По-видимому, именно этим объясняется его влияние на процесс отщепления тиаминпирофосфата от холофермента.

При постановке экспериментов, в которых кальций извне не добавляли, был обнаружен интересный факт: константа Михаэлиса для тиаминпирофосфата равнялась примерно  $3 \cdot 10^{-7}$  [21]. То же самое значение, как мы только что видели, получено и в условиях, когда кальций в системе присутствовал. Таким образом, получалось, что кальций не влияет на величину  $K_m$ , в то время как в прежних опытах (см. рис. 21) его влияние отчетливо наблюдалось. Разница в этих двух сериях экспериментов заключалась в том, что в прежних опытах при определении активности фермент добавляли непосредственно в спектрофотометрическую кювету, содержащую все необходимые для этого компоненты (в том числе и субстраты) и в качестве буфера использовали  $1 \cdot 10^{-1}$  М *трис*. В опытах же, которые рассматриваются в настоящем разделе, использовали  $5 \cdot 10^{-2}$  М глицил-глициновый буфер и перед определением активности проводили предварительную инкубацию апофермента с тиаминпирофосфатом или с тиаминпирофосфатом и кальцием. Поэтому было проверено, как влияет на активность добавление в преникубируемые пробы субстратов и *трис*'а, т. е. в какой-то степени имитировались условия прежних опытов.

Для этого апофермент предварительно инкубировали с коферментом в присутствии рибозо-5-фосфата или фруктозо-6-фосфата и без них, а также в присутствии различных буферов, и только после этого измеряли транскетолазную активность. В каждом случае ставили пробы как с кальцием, так и без него. При определении ферментативной активности функцию субстрата-донора выполнял ксилулозо-5-фосфат, добавляемый в систему в составе смеси фосфопентоз. Ввиду отсутствия индивидуального препарата ксилулозо-5-фосфата влияние на  $K_m$  для тиаминпирофосфата исследовали с фруктозо-6-фос-

Таблица 10

Влияние фосфосахаров и природы буфера на величину константы Михаэлиса для тиаминпирофосфата [21]

Во всех случаях рН 7,6. Опыты с фосфосахарами ставили в  $5 \cdot 10^{-2}$  М глицил-глициновом буфере

| Добавлено в пробу | Концентрация, М     | Величина $K_m$ для тиаминпирофосфата, М $\cdot 10^2$ |            |
|-------------------|---------------------|------------------------------------------------------|------------|
|                   |                     | без кальция                                          | с кальцием |
| Глицил-глицин     | $5 \cdot 10^{-2}$   | 2,7                                                  | 2,9        |
| То же             | $1,5 \cdot 10^{-1}$ | 7,1                                                  | 4,0        |
| Трис-буфер        | $5 \cdot 10^{-2}$   | 15,3                                                 | 2,8        |
| То же             | $1,5 \cdot 10^{-1}$ | 80,0                                                 | 2,8        |
| Рибозо-5-фосфат   | $1,2 \cdot 10^{-3}$ | 3,2                                                  | —          |
| Фруктозо-6-фосфат | $1,2 \cdot 10^{-2}$ | 19,5                                                 | 3,5        |

фатом, который также служит субстратом-донором в транскетолазной реакции, хотя и со значительно меньшей эффективностью, чем ксилулозо-5-фосфат [134].

Как следует из данных, представленных в табл. 10, замена  $5 \cdot 10^{-2}$  М глицил-глицинового буфера на трис-буфер той же концентрации сопровождается повышением величины  $K_m$  примерно в шесть раз. В  $1,5 \cdot 10^{-1}$  М трис-буфере она повышается более чем в пять раз. Аналогичный эффект, хотя выраженный в меньшей степени, наблюдали и при повышении концентрации глицил-глицинового буфера. В присутствии кальция во всех случаях величина  $K_m$  была, по существу, одна и та же и равнялась той, которая определялась в  $5 \cdot 10^{-2}$  М глицил-глициновом буфере и без добавления двухвалентного катиона [21].

Рибозо-5-фосфат никакого влияния на  $K_m$  не оказывал, фруктозо-6-фосфат — тоже, но только в присутствии кальция. Без него константа Михаэлиса для тиаминпирофосфата увеличивалась примерно в 7 раз (опыты ставили в  $5 \cdot 10^{-2}$  М глицил-глициновом буфере). Таким образом, влияние кальция на  $K_m$  для тиаминпирофосфата, получаемое в прежних опытах (см. рис. 21), можно также объяснить снятием ингибирующего действия триса и одного из субстратов транскетолазной реакции. Другие компоненты системы, используемой для измерения транскетолазной реакции, не исследовали. Но нельзя исключить возможность и их влияния на  $K_m$ , по аналогии с тем, что наблюдалось в приведенных выше экспериментах.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТИАМИНПИРОФОСФАТА С ТРАНСКЕТОЛАЗОЙ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ

Для того, чтобы выяснить, в каком виде кофермент связывается с апотранскетолазой — в свободном или в виде комплекса с металлом, были поставлены следующие эксперименты [32]. Апофермент предварительно инкубировали с тиаминпирофосфатом, затем измеряли изменение оптической плотности при 320 нм, характеризующее (как будет показано дальше) взаимодействие с апотранскетолазой молекул тиаминпирофосфата, которые, связавшись с белком, способны выполнять каталитическую функцию.

Суммарная концентрация свободных (т. е. не связанных с белком) двухвалентных катионов в системе была  $1,8 \cdot 10^{-8}$  М. В случае связывания с апотранскетолазой только комплекса тиаминпирофосфата с металлом, но не свободного тиаминпирофосфата, концентрация реконструированного холофермента должна была бы быть не выше  $1,8 \cdot 10^{-8}$  М (такова концентрация свободных катионов в системе). Это составляет лишь 0,4—1,2% от максимально возможного, так как концентрация апотранскетолазы в опытах была  $1,43 \cdot 10^{-6}$ — $4,55 \cdot 10^{-6}$  М.

На самом же деле при проведении экспериментов происходило образование около 77% холофермента от максимально возможного (табл. 11). Отсюда следует, что холотранскетолаза образуется из апотранскетолазы и свободного, не связанного с металлом, кофермента (это, естественно, не означает, что комплекс тиаминпирофосфата с металлом не может взаимодействовать с апоферментом).

Когда транскетолазную активность измеряли с использованием низкой концентрации тиаминпирофосфата без предварительной инкубации кофермента с апоферментом, то наблюдаемая скорость ферментативной реакции менялась во времени с самого начала ее измерения [20]. Сначала она была сравнительно низкой, затем увеличивалась и лишь по прошествии определенного времени стабилизировалась. Особенно отчетливо это проявлялось в отсутствие добавленного извне кальция и с низкими концентрациями кофермента. С повышением содержания тиаминпирофосфата в системе продолжительность фазы начального замедления транскетолазной реакции

Таблица 11

Реконструкция холотранскетолазы из апотранскетолазы и тиаминпирофосфата, измеряемая по изменению величины оптической плотности при 320 нм [32]. Исходное содержание свободных двухвалентных катионов в среде  $1,8 \cdot 10^{-8}$  М

| Концентрация                     |                                  | Изменение оптической плотности при 320 нм $\times 10^4$ |                                                           | Степень реконструкции холотранскетолазы в отсутствие извне добавленных катионов, в % от максимальной * |
|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| апотранскетолаза, М $\cdot 10^6$ | тиаминпирофосфат, М $\cdot 10^4$ | без добавления металла                                  | с добавленным кальцием или магнием ( $3 \cdot 10^{-8}$ М) |                                                                                                        |
| 1,43                             | 1,15                             | 63                                                      | 81                                                        | 78                                                                                                     |
| 2,36                             | 5,6                              | 129                                                     | 162                                                       | 79                                                                                                     |
| 4,55                             | 9,83                             | 192                                                     | 264                                                       | 73                                                                                                     |

\* Рассчитана, исходя из соответствующих величин изменения оптической плотности при 320 нм, измеренных в отсутствие извне добавленных катионов и при их добавлении.

уменьшается, и при достаточно высокой его концентрации скорость реакции становится постоянной с самого начала ее измерения (рис. 22).

Причина наблюдаемой картины — медленная скорость взаимодействия кофермента с апотранскетолазой. Для доказательства этого положения мы воспользовались известным для такого рода систем уравнением [388]:

$$1/\tau = K_{+1} \cdot [S_0] + K_{+1} \cdot K_m.$$

И действительно получили линейность графиков зависимости  $1/\tau$  от  $[S_0]$  (рис. 23). Здесь  $\tau$  — время предстационарного состояния,  $[S_0]$  — начальная концентрация тиаминпирофосфата, а  $K_{+1}$  — константа скорости второго порядка образования комплекса транскетолаза — тиаминпирофосфат. Более того, величина константы Михаэлиса для тиаминпирофосфата в присутствии кальция, определенная из графика (рис. 23, б), равна  $3,0 \cdot 10^{-7}$  М. Такое же значение было получено и по методу двойных обратных величин Лайнуивера-Берка. При этом были использованы экспериментальные данные, полученные в одном случае при измерении ферментативной активности после установления стационарной скорости транскетолазной реакции, а в другом — при измерении актив-

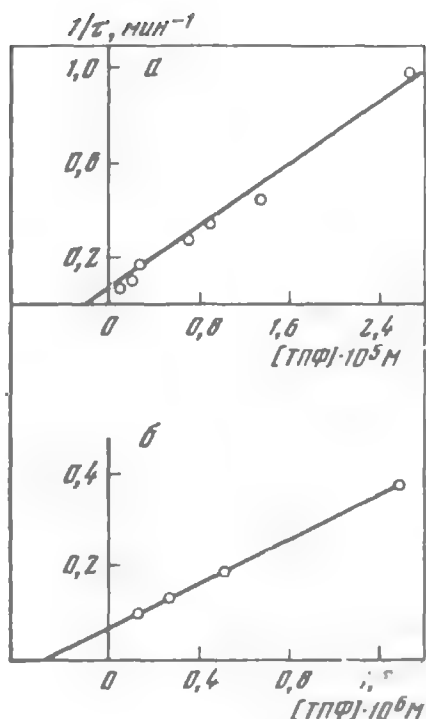
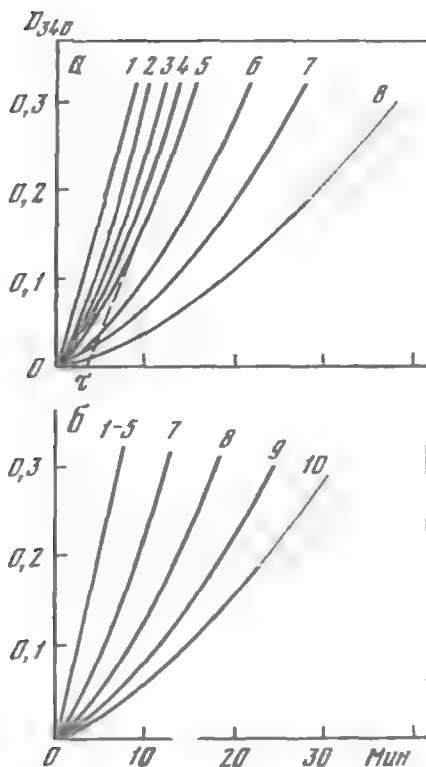


Рис. 22 Влияние разной концентрации тиаминапирофосфата на скорость транскетолазной реакции [20]

а — металл не добавляли; б — добавлен кальций ( $2,1 \cdot 10^{-3}$  М). Концентрация кофермента (М): 1 —  $1,3 \cdot 10^{-4}$ ; 2 —  $2,6 \cdot 10^{-5}$ ; 3 —  $1,3 \cdot 10^{-6}$ ; 4 —  $8,5 \cdot 10^{-6}$ ; 5 —  $6,5 \cdot 10^{-7}$ ; 6 —  $2,6 \cdot 10^{-6}$ ; 7 —  $1,3 \cdot 10^{-6}$ ; 8 —  $5,1 \cdot 10^{-7}$ ; 9 —  $2,6 \cdot 10^{-7}$ ; 10 —  $1,3 \cdot 10^{-7}$

Рис. 23. Длительность фазы начального замедления транскетолазной реакции в зависимости от концентрации тиаминапирофосфата (ТПФ) [20]

а — металл не добавляли; б — добавлен кальций ( $2,1 \cdot 10^{-3}$  М). Величину  $\tau$  определяли, как показано на рис. 22.

ности после предварительной инкубации апотранскетолазы с кофакторами.

По наклону прямых на рис. 23 можно определить соответствующие значения константы скорости взаимодействия тиаминапирофосфата с апоферментом в присутствии кальция и без него. В первом случае оно оказалось равным  $3866 \text{ М}^{-1}\text{сек}^{-1}$ , а во втором —  $529 \text{ М}^{-1}\text{сек}^{-1}$ , т. е. более чем в семь раз ниже. Аналогичная обработка результатов, полученных с магнием, показывает, что в присутствии данного катиона константа скорости взаимодействия тоже повышается, но не столь существенно, как при добавлении кальция [20].

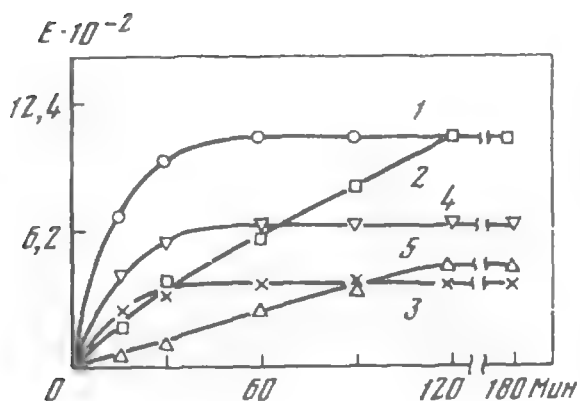


Рис. 24. Влияние аналогов и фрагментов тиаминпирофосфата на реконструкцию холодтранскетолазы [20]

Концентрация кофермента —  $2,6 \cdot 10^{-6}$  М; 1 — проба без добавок; 2 — неорганический ортофосфат ( $5 \cdot 10^{-2}$  М); 3 — тиаминмонофосфат ( $1 \cdot 10^{-2}$  М); 4 — тиамин ( $2 \cdot 10^{-2}$  М); 5 — неорганический пирофосфат ( $5 \cdot 10^{-4}$  М)

Небольшая скорость взаимодействия тиаминпирофосфата с апотранскетолазой могла быть продемонстрирована и непосредственно в опытах, где апотранскетолазу преинкубировали с низкими концентрациями кофермента. Через определенные промежутки времени после начала инкубации отбирали пробы и определяли в них транскетолазную активность без добавления кофакторов. Ее величина характеризовала количество холофермента, образовавшееся в процессе преинкубации апотранскетолазы с тиаминпирофосфатом за данный промежуток времени. В соответствии с предположением время образования холофермента было тем больше, чем меньше кофермента содержалось в пробе [19].

Своеобразным было влияние аналогов тиаминпирофосфата, а также фрагментов молекулы кофермента — пирофосфата и фосфата при их добавлении в преинкубируемую пробу на процесс реконструкции холодтранскетолазы из апофермента и тиаминпирофосфата (рис. 24).

В присутствии фосфата скорость реконструкции существенно снижается (кривая 2), хотя в конце концов холофермента образуется столько же, сколько и в контроле (кривая 1), где фосфат не добавляли. В присутствии тиаминмонофосфата (кривая 3) и свободного тиамина (кривая 4) наблюдается обратная картина — время установления равновесия между холодтранскетолазой и свободными апотранскетолазой и тиаминпирофосфатом остается неизменным, а общее количество холодтранскетолазы уменьшается. При добавлении в пробу неорганического пирофосфата наблюдаются оба эффекта: увеличивается время установления равновесия и уменьшается количество образующегося холофермента.

Специфику влияния аналогов и фрагментов тиамина-пирофосфата можно объяснить, исходя из факта взаимодействия кофермента с апоферментом как минимум по трем точкам и представления о двустадийности процесса образования холотранскетолазы. На первой стадии осуществляется взаимодействие тиаминапирофосфата с апотранскетолазой при участии конечного фосфатного остатка кофермента. В результате этого образуется легко диссоциирующий каталитически неактивный промежуточный комплекс транскетолаза ... тиаминапирофосфат. На второй стадии осуществляется «квазинеобратимое» связывание тиаминапирофосфата с белком при участии других частей молекулы кофермента и образование комплекса транскетолаза — тиаминапирофосфат, характеризующегося каталитической активностью.

Схематически это будет выглядеть так: транскетолаза + тиаминапирофосфат  $\rightleftharpoons$  транскетолаза ... тиаминапирофосфат  $\rightleftharpoons$  транскетолаза — тиаминапирофосфат. Согласно этой схеме, при низкой концентрации тиаминапирофосфата скорость образования стабильного каталитически активного комплекса транскетолаза — тиаминапирофосфат из исходных компонентов будет лимитироваться концентрацией промежуточного комплекса транскетолаза ... тиаминапирофосфат. С повышением исходного количества кофермента концентрация промежуточного комплекса также будет увеличиваться, в результате чего повысится и скорость образования каталитически активного холофермента, что и имело место в эксперименте [19].

Неорганический фосфат уменьшает концентрацию промежуточного комплекса, по-видимому, за счет конкуренции с тиаминапирофосфатом за апофермент, благодаря этому скорость образования активного холофермента снижается (рис. 24, кривая 2). В свою очередь тиаминамонофосфат и свободный тиамин не влияют на первую стадию процесса, где кофермент взаимодействует с апотранскетолазой за счет своего конечного фосфатного остатка, однако эти соединения вмешиваются на второй стадии процесса, являясь конкурентными ингибиторами по отношению к тиаминапирофосфату. Поэтому общее количество каталитически активного холофермента в их присутствии уменьшается (сравни рис. 24, кривые 3, 4 и 1). В присутствии пирофосфата, который является, так же как и тиаминамонофосфат и свободный тиамин,

конкурентным ингибитором транскетолазы и в то же время способен, по аналогии с неорганическим фосфатом, действовать и на первую стадию процесса реконструкции, снижается и скорость реконструкции каталитически активного холофермента и образуется его меньше (рис. 24, кривая 5).

Подтверждение двустадийности процесса образования холотранскетолазы из апофермента и кофермента было получено методом флуоресценции [289]. Этот метод основан на том, что интенсивность флуоресценции апотранскетолазы при 350 нм (возбуждение — при 285 нм) уменьшается в результате присоединения к ней кофермента и образования стабильного каталитически активного холофермента [216]. Это позволяло непосредственно следить за ходом реконструкции холотранскетолазы.

Исходная концентрация тиаминпирофосфата (ТПФ) в опытах была значительно выше исходной концентрации апофермента. При этом условии зависимость концентрации холотранскетолазы (холоТК) от времени  $t$  с момента добавления тиаминпирофосфата в пробу описывается уравнением:

$$[\text{холоТК}]_t = [\text{холоТК}]_{\infty} \cdot (1 - e^{-k_{\text{эфф}} \cdot t}),$$

где  $[\text{холоТК}]_t$  — концентрация холофермента в момент времени  $t$ ;  $[\text{холоТК}]_{\infty}$  — то же при  $t \rightarrow \infty$ ,  $k_{\text{эфф}}$  — эффективная константа скорости псевдопервого порядка. Ее величина зависит от концентрации кофермента и определялась в каждом отдельном случае из графика, выражающего зависимость  $\lg \left( \frac{1 - \Delta I_t}{\Delta I_{\infty}} \right)$  от времени  $t$ , где

$\Delta I_t$  и  $\Delta I_{\infty}$  — изменение интенсивности флуоресценции к моменту времени  $t$  и при  $t \rightarrow \infty$ , которое в данном случае отражает соответствующую концентрацию холотранскетолазы.

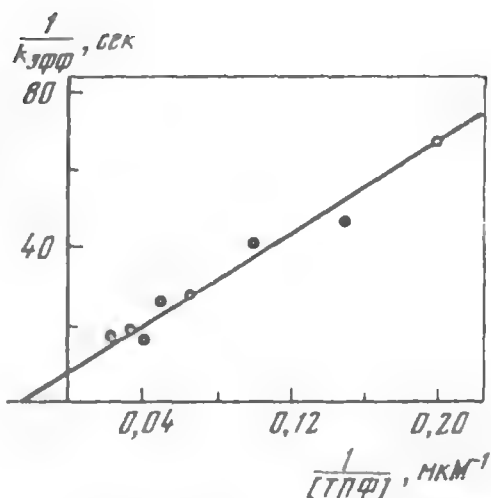
Оказалось, что зависимость  $k_{\text{эфф}}$  от исходной концентрации тиаминпирофосфата описывается уравнением:

$$k_{\text{эфф}} = \frac{k [\text{ТПФ}]_0}{K + [\text{ТПФ}]_0}.$$

Это указывает на то, что взаимодействие кофермента с апотранскетолазой, как и предполагалось, осуществляется по двустадийной схеме:  $\text{апоТК} + \text{ТПФ} \xrightleftharpoons{K} \text{ТК} \dots$



Рис. 25. Зависимость эффективной константы скорости псевдопервого порядка от концентрации тиаминпирофосфата (ТПФ) в присутствии кальция, взятого в насыщающей концентрации [289]



...ТПФ  $\rightarrow$  ТК—ТПФ, где  $K$  — константа диссоциации промежуточного комплекса, а  $k$  — мономолекулярная константа скорости второй стадии. Они равны, исходя из данных рис. 25, соответственно  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М и  $0,103$  сек $^{-1}$ .

#### ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ ТИАМИНПИРОФОСФАТА, УЧАСТВУЮЩИЕ В ЕГО СВЯЗЫВАНИИ АПОПИРУВАТДЕКАРБОКСИЛАЗОМ

В разделе, где рассматривался механизм действия тиаминовых ферментов, уже указывалось, что взаимодействие субстрата с коферментом происходит по второму углеродному атому тиазолового кольца. Последующее отщепление ацетальдегида, образующегося в процессе пируватдекарбоксилазной реакции, и выделение его в среду осуществляется при участии аминокетонной группы тиаминпирофосфата.

Для выяснения функциональной значимости других частей молекулы тиаминпирофосфата в проявлении им каталитической функции и во взаимодействии его с апопируватдекарбоксилазой был синтезирован целый ряд аналогов кофермента [436, 437, 443—445, 447]. Для их характеристики использовали следующие методы [443, 447].

1. Коэнзимную способность аналогов определяли после их преинкубации с апоферментом, с последующим измерением ферментативной активности. Отсутствие активности могло быть обусловлено потерей собственно

каталитических функций модифицированным коферментом или неспособностью аналога связываться с апоферментом.

2. Для выяснения относительного сродства аналога к апоэнзиму последний инкубировали с избыточными концентрациями аналога и тиаминпирофосфата, взятыми в соотношении 1 : 1. Определяемая активность при этом должна снижаться, если аналоги связываются с белком «необратимо» (по типу неизмененного кофермента); в противном случае — оставаться неизменной.

3. О стабильности связи между апопируватдекарбоксилазой и модифицированным коферментом судили по активности, определяемой до и после пропускания через ссфадкс апофермента, предварительно преинкубированного с аналогом. Для определения степени насыщения белкового компонента неактивными производными тиаминпирофосфата их метили по фосфору и затем определяли радиоактивность в элюате.

Во всех трех случаях опыты проводили с пируватдекарбоксилазой пивных дрожжей в присутствии магния, взятого в насыщающей концентрации. Были получены следующие результаты [438, 443, 446—448]. 4'-Окси-4'-дезаминотПФ, аналог кофермента, у которого аминокетильная группа заменена на гидроксил, не отделяется от апофермента при гель-фильтрации, снижает пируватдекарбоксилазную активность на 50% при добавлении вместе с тиаминпирофосфатом в соотношении 1 : 1 и полностью лишен коферментной функции (табл. 12).

Согласно трем тестам, предложенным выше, это означает, что у данного аналога кофермента отсутствует группа, выполняющая каталитическую функцию, в то время как группы, участвующие в связывании с белком, остались неизменными. Другими словами, аминокетильная группа тиаминпирофосфата, которой нет в 4'-окси-4'-дезаминотПФ, выполняет каталитическую функцию (о чем говорилось выше при рассмотрении механизма действия тиаминных ферментов) и не участвует в связывании с апоферментом (хотя предполагается наличие тесного контакта между данной группой и поверхностью белка) [433]. Подтверждается это и с другими аналогами тиаминпирофосфата, в которых аминокетильная группа отсутствует (дезаминотПФ) или модифицирована (N-метилтПФ и N,N-диметилтПФ) (см. табл. 12).

Таблица 12

*Коферментная активность аналогов тиаминпирофосфата, относительное сродство их к апопируватдекарбоксилазе и стабильность связи между аналогами и апопируватдекарбоксилазой [515]*

| Пирофосфорилированные производные указанных соединений | Относительная стабильность связи с апопируватдекарбоксилазой * | Коферментная активность * | Степень нигбирования пируватдекарбоксилазной активности ** |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------|
| Тиамин                                                 | 100                                                            | 100                       | —                                                          |
| 4'-Окси-4'-дезаминотиамин                              | 100                                                            | 0                         | 52                                                         |
| Дезаминотиамин                                         | —                                                              | 0                         | 30                                                         |
| N-Метилтиамин                                          | 1                                                              | 0                         | 25                                                         |
| N,N-Диметилтиамин                                      | —                                                              | 0                         | 22                                                         |
| 6'-Метил-4-нортиамин                                   | 100                                                            | 22                        | —                                                          |
| 4-Нортиамин                                            | 4                                                              | 24                        | 25                                                         |
| N-1-Пиридиновый аналог                                 | 6                                                              | 13                        | 11                                                         |
| N-3-Пиридиновый аналог                                 | 0                                                              | 0                         | 0                                                          |

\* Для ТПФ принимается равной 100.

\*\* Определяемая при соотношении аналог : кофермент, равном 1:1.

Для изучения функций атомов азота пиримидинового кольца кофермента были синтезированы два аналога, каждый из которых содержал только один атом азота в кольце [437, 446]. N-1-Пиридиновый аналог (VII) содержал азот в первом положении, а N-3-пиридиновый аналог (VIII) в третьем положении. Лишь первый из них проявлял коэнзимную активность, в то время как второй не обладал каталитической активностью и был неспособен связываться с апоферментом [446, 448].

Следовательно, 3'-N-атом не является необходимым ни для осуществления каталитического акта, ни для связывания с белком, хотя в его отсутствие стабильность связи тиаминпирофосфат-апопируватдекарбоксилаза снижается (см. табл. 12). В то же время атом азота, находящийся в первом положении пиримидинового кольца, необходим для осуществления тиаминпирофосфатом его коэнзимной функции. Способность N-1-пиридинового аналога (в противоположность N-3-аналогу) связываться с апопируватдекарбоксилазой указывает на участие 1'-N-

атома в образовании связи между коферментом и апоферментом. Эта связь может быть водородной, что согласуется с незначительной способностью тиаминпирофосфата связываться с апоферментом при pH ниже 5 (значение pH, соответствующее значению  $pK_a$  удаления протона от 1'-атома азота тиаминпирофосфата) [351]. Не исключается и возможность того, что связь 1'-атома азота кофермента с белком опосредована через ион металла [163, 432, 546].

Удаление метильной группы из четвертого положения тиазолового кольца (4-норТПФ) почти полностью лишает возможности кофермент необратимо связываться с апоферментом. Стабильность холофермента восстанавливается до исходной величины, если в 6'-положение 4-норТПФ ввести метильную группу (см. табл. 12). Таким образом, 4- $CH_3$ -группа тиаминпирофосфата необходима для стабилизации связи кофермент-апофермент, причем положения 4- и 6'- в этом смысле эквивалентны: производные с метильной группой в одном из этих положений имеют одинаковое сродство к апируватдекарбоксилазе. Дополнительные данные о функциональных группах тиаминпирофосфата были получены при использовании некоторых других аналогов кофермента с определением величин констант ингибирования. Опыты ставили с тем же ферментом — пируватдекарбоксилазой пивных дрожжей.

Как следует из данных, представленных ниже,  $K_m$  для тиаминпирофосфата равна  $2,3 \cdot 10^{-5}$  М, что соответствует данным других авторов [229]. При удалении 2'-метильной группы (2'-деметил ТПФ) сродство кофермента к пируватдекарбоксилазе уменьшается примерно в 10 раз. Это указывает на участие 2'-метильной группы тиаминпирофосфата в связывании его с апоферментом, которое осуществляется, по-видимому, путем гидрофобного взаимодействия. Подтверждением этому служат опыты, поставленные с 2'-оксиТПФ (IV) и 2'-метоксиТПФ (XI). Основываясь на величине ингибиторной константы, можно сказать, что первый аналог имеет очень низкое сродство к апоэнзиму. Замена в нем гидроксильной группы на  $CH_3$ -О-группу (второй аналог) повышает его сродство в пять раз, по-видимому, вследствие взаимодействия гидрофобного участка белка с вновь введенной в аналог метильной группой.

Ниже приведены кинетические константы для тиамина-пирофосфата и его аналогов [555].

| Пирофосфорилированные производные указанных соединений | Константа Михаэлиса, мкМ | Ингибиторная константа, мкМ |
|--------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Тиамин                                                 | 23                       | —                           |
| 2'-Этилтиамин                                          | 20                       | —                           |
| 2'-н-Бутилтиамин                                       | —                        | 45                          |
| 2'-Метокситиамин                                       | —                        | 70                          |
| 2'-Деметилтиамин                                       | —                        | 220                         |
| 2'-Окситиамин                                          | —                        | 380                         |

2'-ЭтилТПФ (IX) — единственный аналог, способный выполнять коферментную функцию, связывается с белком в такой же степени, как и нативный кофермент, однако в его присутствии активность составляет лишь 25% активности, наблюдаемой с тиаминапирофосфатом (аналогичные данные получены и группой японских авторов [379]). Следовательно, для проявления каталитической активности к коферменту предъявляются более жесткие структурные ограничения, чем для его взаимодействия с апоферментом. На это же указывает и отсутствие коэнзимных функций у 2'-метоксипТПФ и 2'-н-бутилТПФ (X), хотя сродство их к апопируватдекарбоксилазе лишь незначительно отличается от сродства тиаминапирофосфата к ферменту (см. выше).

Тиохромпирофосфат (VI) является конкурентным по отношению к тиаминапирофосфату ингибитором пируватдекарбоксилазы пекарских дрожжей [554]. Взаимодействие этого аналога с апопируватдекарбоксилазой в присутствии магния сопровождается увеличением интенсивности его флуоресценции и сдвигом максимума эмиссии в коротковолновую область спектра. На рис. 26 показано образование тройного комплекса между тиохромпирофосфатом, магнием и апоферментом при добавлении магния к смеси апоэнзима с тиохромпирофосфатом (кривая 4), а на рис. 27 — то же, но при добавлении аналога к двум другим компонентам (кривая 3). Таким образом, последовательность добавления катиона и тиохромпирофосфата к апоферменту роли не играет, а наличие магния является необходимым условием образования тройного комплекса (незначительное увеличение флуоресценции, наблюдаемое в отсутствие добавленного магния (рис. 26,

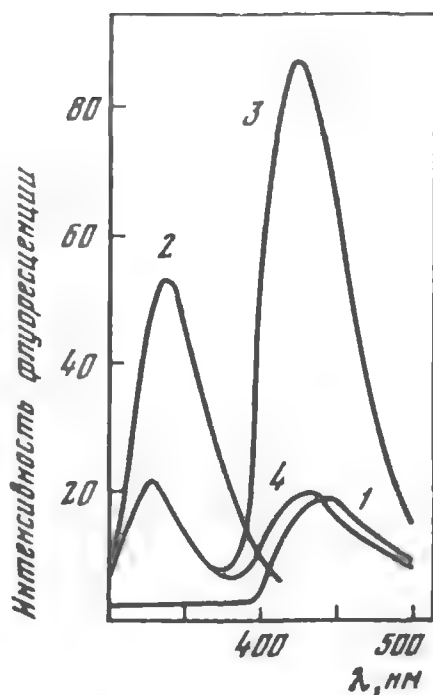
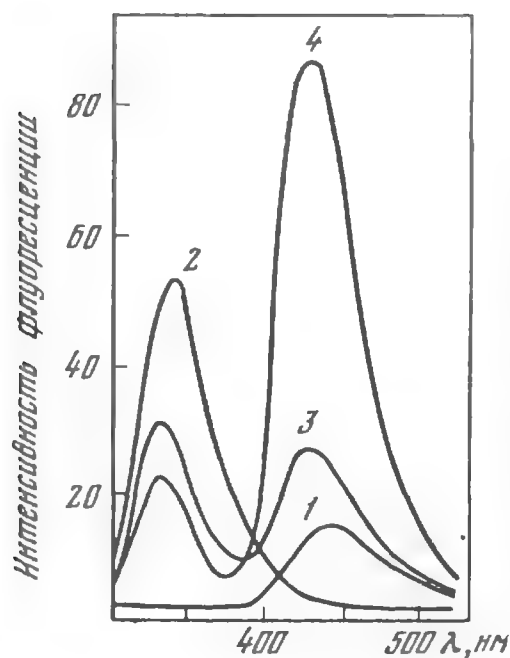


Рис. 26. Влияние магния на образование комплекса пируватдекарбоксилаза — тиохромпирофосфат [554]

1 — тиохромпирофосфат; 2 — апофермент; 3 — апофермент + тиохромпирофосфат; 4 — как 3, только затем был добавлен магний

Рис. 27. Образование тройного комплекса между тиохромпирофосфатом, магнием и апопируватдекарбоксилазой [554]

1 — тиохромпирофосфат + магний; 2 — апопируватдекарбоксилаза + магний; 3 — как 2, но затем добавлен тиохромпирофосфат; 4 — как 3, но затем добавлен тиаминпирофосфат

кривая 3), обусловлено наличием катионов в системе в качестве примеси. То же самое относится к пирофосфатной группе, так как тиохром, если судить по отсутствию изменения флуоресценции, не взаимодействует с апопируватдекарбоксилазой ни в отсутствие магния, ни в том случае, когда металл был добавлен. Добавление тиаминпирофосфата к тройному комплексу снижает интенсивность флуоресценции к исходной величине, характерной для свободного тиохромпирофосфата (см. рис. 27, кривая 4). Это указывает на вытеснение тиохромпирофосфата из комплекса и замещение его коферментом. Как взаимодействие тиохромпирофосфата с апоферментом, так и вытеснение его коферментом осуществляется во времени, подтверждая тем самым факт низкой скоро-

сти образования холофермента, установленный ранее [415, 433, 438, 442].

Результаты, полученные с тioxромпирoфoсфaтoм, а также отсутствие коэнзимной активности у тиaминa и тиaминмoнoфoсфaтa [78, 179, 180, 182] и ингибирующее действие пирoфoсфaтa [552] указывают на существенную роль пирoфoсфaтнoгo oстaткa вo взиaмoдeйствии кoфeрмeнтa и aнoфeрмeнтa, с oбpaзoвaниeм стaбильнoгo xолoфeрмeнтa.

На основании опытов с тioxромпирoфoсфaтoм и тioxрoмoм, o кoтoрых гoвoрилось выше, предпoлaгaeтся, что связь пирoфoсфaтнoгo oстaткa с бeлкoм мoжeт бeть oпoсpeдoвaнa чeрeз иoн мeтaллa [554]. На основании имеющихся литературных данных трудно сказать, с чем же в действительности связывается металл в холоферменте — с пирoфoсфaтнoм oстaткoм тиaминпирoфoсфaтa или с aтoмoм азoтa в пepвoм пoлoжeнии пиримидинoвoгo кoльцa [432]. Не исключена реализация обеих этих возможностей.

Подводя итог рассмотрению литературных данных, посвященных изучению функциональной роли отдельных участков молекулы тиaминпирoфoсфaтa, мoжнo скaзaть слeдующee. Нeпoсpeдствeннoe учaстие в кaтaлизe пpинимaют втoрoй углepoдный aтoм тiazолoвoгo кoльцa и aминoгpуппa в чeтвeртoм пoлoжeнии пиримидинoвoгo кoльцa кoфeрмeнтa. Сущeствeннoe влияниe нa рeaкциoннoспoсoбнoсть втoрoгo углepoднoгo aтoмa oкaзывают пиримидинoвoе кoльцo [106, 379] и  $\beta$ -oкcиэтильнaя гpуппa тиaминпирoфoсфaтa [37, 376, 418]. Для нoрмaльнoгo oсущeствлeния кaтaлитичeскoй фyнкции мoлeкyлa кoфeрмeнтa дoлжнa бeть cooтвeтствyющeм oбpaзoм oриeнтирoвaнa и имeть стрoгo oпpeдeлeннyю пpocтpaнствeннyю кoнфигyрaцию. Пoэтoмy дaжe нeбoльшиe измeнeния в стpyктype тиaминпирoфoсфaтa coпpoвoждaются рeзким нapyшeниeм eгo кoфeрмeнтных свoйств.

В связывании кoфeрмeнтa с aпoфeрмeнтoм yчaствyют aтoм азoтa в пepвoм пoлoжeнии пиримидинoвoгo кoльцa, 4- и 2'-мeтильнe, a тaкжe пирoфoсфaтнaя гpуппa. Нeoбxoдимo, кpoмe тoгo, нaличия мeтилeнoвoгo мoстикa. Егo удлинeниe дaжe нa oднy мeтилeнoвyю гpуппy дaeт пpoизвoднoe кoфeрмeнтa, кoтoрoe нeaктивнo и нe связывaeтся с фeрмeнтoм [439]. Чтo кaсaeтся aтoмa сeры тiazолoвoгo кoльцa, тo тpyднo скaзaть чтo-либo oпpeдeлeннoс

относительно ее функции. Опыты с имидазольным аналогом (производное тиаминапирофосфата, в котором тиазоловое кольцо заменено на имидазольное) мало что дают в этом смысле. Правда, показано, что он неактивен, а по прочности связи с белком почти не отличается от нативного кофермента [445], но из этого еще не следует, что атом серы участвует в катализе. Дело в том, что в имидазольном аналоге понижена кислотность атома водорода при втором углероде и, кроме того, отсутствует четвертичный азот, который есть в неизменном коферменте и который, очевидно, необходим для коэнзимной активности тиаминапирофосфата. Все же имеющиеся литературные данные позволяют с большой долей вероятности утверждать, что в стабилизации связи тиаминапирофосфата в холоферменте сера участия не принимает, но в катализе ее роль отрицать нельзя [34].

Отметим, что сере тиазолового компонента отводится определенная роль при протенизации тиамина в тканях организма [39, 43, 44].

#### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОФАКТОРОВ С ПИРОВАТДЕКАРБОКСИЛАЗОЙ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Многие ферменты, которые не теряют тиаминапирофосфат в процессе выделения и очистки, достаточно легко диссоциируют на апофермент и кофермент при смещении рН в щелочную сторону. Исходя из необратимости связывания кофермента с апоферментом в нейтральной или слабокислой среде (при пропускании через сефадекс тиаминапирофосфат не отщепляется от холофермента), следовало ожидать восстановления ферментативной активности при переходе к исходным условиям, т. е. образования холофермента при подкислении раствора. Но этого не происходило, что нельзя было объяснить нарушением структуры апофермента, так как каталитическая активность фермента восстанавливалась при последующем добавлении тиаминапирофосфата.

Добавлять его требовалось, однако, в значительном избытке, на несколько порядков превышающем первоначальную его концентрацию. Стабильность реконструированного фермента не отличалась от стабильности нативного фермента: пропускание через сефадекс для удале-



ния свободного кофермента не изменяло величины определяемой активности. Указанный феномен в свое время был назван «большой загадкой ресинтеза». Для пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей эту загадку удалось разрешить в лаборатории Шелленбергера [433, 438, 443, 448]. В опытах использовали фермент, лишенный тиаминпирофосфата. За процессом реконструкции (образования холофермента) следили по величине ферментативной активности. Было показано, что при низкой концентрации тиаминпирофосфата его взаимодействие с апоферментом осуществляется медленно. При повышении концентрации скорость реконструкции холофермента увеличивалась, однако до определенного предела, после которого дальнейшее повышение концентрации кофермента влияния не оказывало. Удалось рассчитать константу диссоциации двойного комплекса апопируватдекарбоксилаза — тиаминпирофосфат. Она оказалась равной  $6,5 \cdot 10^{-4}$  М и не зависела от концентрации магния в системе. Для константы диссоциации двойного комплекса апопируватдекарбоксилаза — магний была получена величина  $1,13 \cdot 10^{-3}$  М, которая в свою очередь не зависела от концентрации в растворе кофермента. Таким образом, оба первичных процесса реконструкции — присоединение магния и тиаминпирофосфата к активному центру апофермента — осуществляются независимо один от другого. Двойные комплексы тиаминпирофосфата и магния с апоферментом нестабильны и легко распадаются на исходные компоненты при пропускании через сефадекс. Тройной комплекс магний — апопируватдекарбоксилаза — тиаминпирофосфат прочный и при гель-фильтрации не распадается. Следовательно, жесткое связывание тиаминпирофосфата возможно только в присутствии магния, и наоборот, магний прочно связывается с белком только при наличии в системе кофермента. Другими словами, образование стабильного холоэнзима возможно только при одновременном участии всех трех компонентов.

Существенное влияние на процесс реконструкции холопируватдекарбоксилазы оказывает субстрат этого фермента — пировиноградная кислота. Ее наличие в среде не сказывается на состоянии равновесия между коферментом или магнием и апоферментом, однако константа скорости процесса реконструкции холофермента увеличивается примерно в 10 раз.

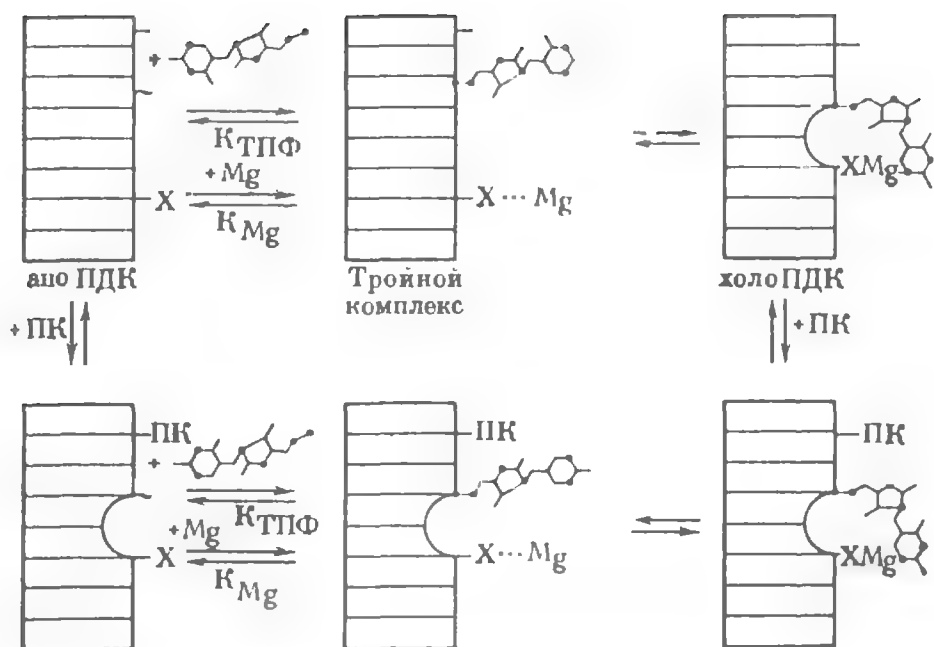


Рис. 28. Реконструкция холопируватдекарбоксилазы (схема)

Суммируя полученные экспериментальные данные, Шелленбергер [433] предлагает следующую схему реконструкции холопируватдекарбоксилазы (см. рис. 28). Вначале тиаминпирофосфат и магний относительно быстро, обратимо и независимо один от другого взаимодействуют с апоферментом, в результате чего образуется «открытый» тройной комплекс. Последний затем «замыкается» с образованием стабильного (квазинеобратимого) комплекса, т. е. холоэнзима. Эта стадия — лимитирующая в общем процессе реконструкции. И именно здесь проявляется активирующее действие субстрата. Лимитирующая стадия связана, как полагают, с конформационными перестройками в активном центре [254, 433, 438, 442].

Как уже указывалось выше, для константы диссоциации двойного комплекса апопируватдекарбоксилаза — тиаминпирофосфат было получено значение  $6,5 \cdot 10^{-4}$  М. В то же время в физиологических условиях концентрация тиаминпирофосфата в дрожжевой клетке на два порядка ниже. Поэтому следует предположить, что *in vivo* кофакторы встраиваются в пируватдекарбоксилазу пивных дрожжей уже непосредственно в процессе синтеза белкового компонента [432].

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОФАКТОРОВ С ДРУГИМИ ТИАМИНОВЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

Взаимодействие пируватдекарбоксилазы пекарских дрожжей с кофакторами исследовали Морей и Джуни [361]. Ниже приводятся данные о потребности в кофакторах нативной пируватдекарбоксилазы пекарских дрожжей:

Перед гель-фильтрацией препарат фермента был преинкубирован (там, где это указано) в  $1 \cdot 10^{-1}$  М фосфатном буфере, pH 6,4, при 30° в течение 30 мин; кофакторы в преинкубируемую смесь добавляли в концентрации: тиаминпирофосфат —  $2,1 \cdot 10^{-3}$  М; магний —  $1 \cdot 10^{-2}$  М

| Номер и условия эксперимента                | Активность<br>(без добавок) * |
|---------------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Исходный экстракт из дрожжей             | 80                            |
| 2. Гель-фильтрация (эксп. 1)                | 78                            |
| 3. Гель-фильтрация (эксп. 1 + ТПФ + магний) | 97                            |
| 4. После отщепления ТПФ                     | 0                             |
| 5. Гель-фильтрация (эксп. 4 + ТПФ)          | 45                            |
| 6. Гель-фильтрация (эксп. 4 + ТПФ + магний) | 90                            |
| 7. Гель-фильтрация (эксп. 6)                | 90                            |

\* В % от активности, измеренной с добавлением  $6,53 \cdot 10^{-4}$  М ТПФ и  $6,25 \cdot 10^{-2}$  М магния.

Авторы показали, что в бесклеточном экстракте фермент присутствует на 80% в виде холофермента (эксп. 1). Добавление обоих кофакторов вместе и даже одного тиаминпирофосфата увеличивает величину определяемой активности на 20%. Пропускание исходного экстракта через сефадекс для удаления свободных кофакторов не изменяет процентное содержание холофермента (эксп. 2). Аналогичные результаты были получены и в том случае, если перед пропусканием через сефадекс экстракт преинкубировали с магнием и тиаминпирофосфатом, взятыми в насыщающей концентрации (эксп. 3). Таким образом, как в исходном холоферменте, так и в реконструированном, кофакторы связаны необратимо.

После разобщения активность пируватдекарбоксилазы полностью зависела от добавления тиаминпирофосфата

и магния. Для выяснения вопроса о том, обратимо или необратимо связываются тиаминпирофосфат и магний с разобщенным апоферментом, его преинкубировали с насыщающими концентрациями кофакторов, взятыми вместе или раздельно, пропускали через сефадекс и измеряли активность. Оказалось, что в отсутствие тиаминпирофосфата металл не связывается с белком.

В пируватдекарбоксилазе, преинкубированной с тиаминпирофосфатом в концентрации, насыщающей фермент на 70%, после пропускания через сефадекс проявлялось лишь 45% активности (эксп. 5). Если фермент преинкубировался с обоими кофакторами, то после гель-фильтрации сохранялось 90% активности (эксп. 6). Вторичное пропускание через сефадекс (эксп. 7) не влияло на активность.

Таким образом, холофермент, реконструированный в отсутствие добавленного магния, в результате пропускания через сефадекс теряет около 25% тиаминпирофосфата (судя по величине ферментативной активности). Если реконструкцию холопируватдекарбоксилазы осуществляли путем инкубации апофермента с обоими кофакторами, то при последующей гель-фильтрации теряется лишь 10% кофермента. Эти данные указывают на то, что связывание тиаминпирофосфата с апотранскетотазой пекарских дрожжей в присутствии двухвалентных катионов осуществляется иначе, чем в их отсутствие.

ЭДТА снижает степень реконструкции холофермента только если он добавляется к апопируватдекарбоксилазе перед добавлением кофакторов или одновременно с ними. ЭДТА, добавленный после магния и тиаминпирофосфата, никакого влияния не оказывает. Это указывает на то, что в данном случае, как и в опытах с пируватдекарбоксилазой пивных дрожжей, образование холофермента из апофермента и кофакторов осуществляется с низкой скоростью. Подтверждение этому было получено в экспериментах, где использовали низкие концентрации тиаминпирофосфата и измеряли пируватдекарбоксилазную активность через разные промежутки времени после смешивания исходных компонентов в отсутствие ЭДТА.

Результаты реконструкции пируватдекарбоксилазы *Zygomonas mobilis* представлены ниже.

Перед гель-фильтрацией ферментный препарат был преинкубирован как на стр. 125

| Номер и условия эксперимента                | Активность<br>(без добавок) * |
|---------------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Исходный экстракт                        | 84                            |
| 2. Гель-фильтрация (эксп. 1)                | 74                            |
| 3. Гель-фильтрация (эксп. 1 + ТПФ + магний) | 79                            |
| 4. После отщепления ТПФ                     | 0                             |
| 5. Гель-фильтрация (эксп. 4 + ТПФ)          | 14                            |
| 6. Гель-фильтрация (эксп. 4 + ТПФ + магний) | 71                            |

\* В % от активности, измеренной с добавлением  $6,53 \cdot 10^{-4}$  М ТПФ и  $6,25 \cdot 10^{-3}$  М магния.

Опыты ставили так же, как и с пируватдекарбоксилазой пекарских дрожжей (см. на стр. 125). Пируватдекарбоксилазная активность бесклеточных экстрактов *Z. mobilis* без добавления кофакторов составляла 84% от активности, измеренной в присутствии насыщающей концентрации тиаминпирофосфата и магния (эксп. 1). В результате гель-фильтрации она снижалась до 74% (эксп. 2). Только тиаминпирофосфат практически не стимулировал активность исходного экстракта. После гель-фильтрации бесклеточных экстрактов, преинкубированных с тиаминпирофосфатом и магнием, сохранялось 79% ферментативной активности (эксп. 3). Таким образом, только 70—80% фермента связывает кофакторы необратимо (пируватдекарбоксилаза пекарских дрожжей — около 100%, см. выше). Полностью разобщенный фермент частично активировался тиаминпирофосфатом, однако после гель-фильтрации оставалось лишь 14% активности (эксп. 5). Тот же фермент, но преинкубированный с обоими кофакторами, после гель-фильтрации сохранял 71% каталитической активности (эксп. 6). Еще более резкие различия в связывании кофермента, в зависимости от условий эксперимента, наблюдаются при исследовании других тиаминовых ферментов (табл. 13—15).

В бесклеточных экстрактах из *Micoglossus ugeae* диацетилкарболигаза находится почти исключительно в виде холофермента (см. табл. 13, эксп. 1). Однако при гель-фильтрации его количество снижается примерно наполовину (эксп. 2) и еще в большей степени — при повторном пропускании через сефадекс (эксп. 3). Приведенные результаты указывают на то, что в данном случае тиамин-

Таблица 13

Потребность в кофакторах для диацетилкарболигазы  
из *Micrococcus ureae* [361]

| Номер и условия эксперимента | Активность * |                                            |
|------------------------------|--------------|--------------------------------------------|
|                              | без добавок  | с добавлением<br>$8,3 \cdot 10^{-4}$ М ТПФ |
| 1. Исходный экстракт         | 92           | —                                          |
| 2. Гель-фильтрация (эксп. 1) | 45           | 80                                         |
| 3. Гель-фильтрация (эксп. 2) | 18           | —                                          |

\* В % от активности, измеренной с добавлением  $6,53 \cdot 10^{-4}$  М ТПФ и  $6,25 \cdot 10^{-3}$  М магния.

Таблица 14

Потребность в кофакторах для ацетолактатсинтетазы  
из *Aerobacter aerogenes* [361]

Перед гель-фильтрацией ферментный препарат был преинкубирован  
(как на стр. 125)

| Номер и условия эксперимента                 | Активность * |                                               |
|----------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------|
|                                              | без добавок  | с добавлением<br>$3,9 \cdot 10^{-3}$ М<br>ТПФ |
| 1. Исходный экстракт                         | 61           | 90                                            |
| 2. Гель-фильтрация (эксп. 1)                 | 61           | —                                             |
| 3. Гель-фильтрация (эксп. 1+ТПФ+маг-<br>ний) | 67           | —                                             |

\* В % от активности, измеренной с добавлением  $6,53 \cdot 10^{-4}$  М ТПФ и  $6,25 \cdot 10^{-3}$  М магния.

пирофосфат связан с апоферментом обратимо, но диссоциация осуществляется медленно.

В случае ацетолактатсинтетазы из *Aerobacter aerogenes* (табл. 14) в исходном бесклеточном экстракте обнаруживается примерно 60% холофермента (эксп. 1); тиаминпирофосфат в нем связан необратимо и не может быть удален пропусканием через сефадекс (эксп. 2). Фермент почти полностью активируется коферментом и в отсутствие металла (эксп. 1). После пропускания через сефадекс фермента, предварительно выдержанного с

Таблица 15

Потребность в кофакторах для некоторых тиаминовых ферментов [361]

Перед гель-фильтрацией ферментные препараты были пренинкубированы (как на стр. 125)

| Номер и условия эксперимента | Активность * |                      |                     |                     |
|------------------------------|--------------|----------------------|---------------------|---------------------|
|                              | без добавок  | с добавлением ТПФ, М |                     |                     |
|                              |              | $1,3 \cdot 10^{-4}$  | $6,5 \cdot 10^{-4}$ | $1,3 \cdot 10^{-3}$ |

Глиоксилаткарболигаза из *E. coli*

|                                         |    |    |    |    |
|-----------------------------------------|----|----|----|----|
| 1. Исходный экстракт                    | 56 | 78 | —  | 88 |
| 2. Гель-фильтрация (эксп. 1)            | 48 | 54 | —  | 69 |
| 3. Гель-фильтрация (эксп. 1+ТПФ+магний) | 52 | —  | 70 | —  |

Пируватоксидаза из *Proteus vulgaris*

|                                         |   |   |     |    |
|-----------------------------------------|---|---|-----|----|
| 4. Исходный экстракт                    | 2 | — | 100 | —  |
| 5. Гель-фильтрация (эксп. 4+магний)     | 0 | — | 39  | 58 |
| 6. Гель-фильтрация (эксп. 4+ТПФ+магний) | 3 | 9 | —   | —  |

Пируватдекарбоксилаза из *E. coli*

|                                         |    |    |   |   |
|-----------------------------------------|----|----|---|---|
| 7. Исходный экстракт                    | 14 | 69 | — | — |
| 8. Гель-фильтрация (эксп. 7+магний)     | 0  | 30 | — | — |
| 9. Гель-фильтрация (эксп. 7+ТПФ+магний) | 0  | 30 | — | — |

\* В % от активности, измеренной с добавлением  $6,53 \cdot 10^{-4}$  М ТПФ и  $6,25 \cdot 10^{-3}$  М магния.

обоими кофакторами, сохраняется 67% активности (эксп. 3), т. е. примерно столько же, сколько было в исходном бесклеточном экстракте.

Подобные результаты были получены с глиоксилаткарболигазой *E. coli*, только в данном случае существенная активация фермента без добавления металла достигалась при более высоких концентрациях тиаминопирофосфата (табл. 15, эксп. 1—3).

Пируватоксидаза в бесклеточных экстрактах *Proteus vulgaris* была практически неактивна без добавления ко-

факторов, но активность полностью проявлялась при добавлении тиаминпирофосфата (см. табл. 15, эксп. 4). После гель-фильтрации наблюдалась лишь частичная активация коферментом (эксп. 5). Фермент, преинкубированный с тиаминпирофосфатом и магнием и затем пропущенный через сефадекс, был неактивен без добавления кофакторов (эксп. 6). Подобным образом ведет себя и пируватдекарбоксилаза в экстрактах *E. coli* (эксп. 7—9). Следовательно, эти два фермента связывают кофакторы обратимо.

Перечисленные выше ферменты характеризуются двумя общими свойствами: все они неспособны необратимо связывать магний (в отсутствие свободного кофермента) и все в той или иной степени активируются только тиаминпирофосфатом. Степень же связывания кофермента и прочность его связи с белком различны. Так, например, нативная пируватдекарбоксилаза пекарских дрожжей взаимодействует с тиаминпирофосфатом практически полностью необратимо (см. данные на стр. 125, эксп. 3), в то время как пируватоксидаза *P. vulgaris* и пируватдекарбоксилаза *E. coli* — полностью обратимо (см. табл. 15). Два других фермента — ацетолактатсинтетаза *A. aerogenes* (см. табл. 14) и глиоксилаткарболигаза *E. coli* (см. табл. 15) — занимают в этом смысле промежуточное положение. Примерно половинные количества этих ферментов связывают тиаминпирофосфат обратимо, а оставшиеся количества — необратимо. Это может указывать на гетерогенность данных препаратов ферментов по их способности взаимодействовать с коферментом. В пользу такой возможности свидетельствует и то, что при незначительном смещении pH в щелочную сторону от пируватдекарбоксилазы пекарских дрожжей отщепляется только часть тиаминпирофосфата, оставшееся же количество остается прочно связанным с апоферментом [361]. От фосфокетолазы из *Acetobacter xylinum* примерно половина общего количества тиаминпирофосфата отщепляется довольно легко уже в процессе выделения и очистки фермента, а оставшееся количество каталитически активного кофермента не может быть удалено даже с применением достаточно жестких воздействий [451].

Пируватдекарбоксилаза пекарских дрожжей, частично разобшенная от кофакторов, после ее обработки из-



бытком тиаминпирофосфата и магния связывает кофермент практически только необратимо (см. данные на стр. 125, эксп. 3). После полного разобщения от кофакторов способным к необратимому связыванию тиаминпирофосфата оказывается уже только 90% фермента (эксп. 6). Таким образом, в процессе разобщения пируватдекарбоксилазы часть ее теряет способность связывать кофермент необратимо, хотя сохраняет каталитическую активность. Последняя проявляется в присутствии избытка кофакторов.

Способность тиаминпирофосфата в отсутствие магния активировать полностью разобщенную от кофакторов пируватдекарбоксилазу пекарских дрожжей могла быть обусловлена наличием в системе примеси металлов. Поэтому была предпринята попытка по возможности полно удалить металлы, которые могли присутствовать в компонентах реакционной смеси и влиять на свойства фермента в отсутствие извне добавленных катионов. С этой целью все реагенты обрабатывали смолрой с высоким сродством к ионам двухвалентных металлов. Это, однако, не дало ожидаемых результатов: активация одним тиаминпирофосфатом все еще наблюдалась.

До последнего времени считалось общепризнанным (на основании известных литературных данных), что тиаминовые ферменты устойчивы в нейтральной и слабокислой среде, а подщелачивание среды благоприятствует отщеплению тиаминпирофосфата от холофермента. Однако исследования, проведенные Решеляускайте и др. [48], заставляют пересмотреть категоричность такого суждения. Авторы выделяли пируватдекарбоксилазу (входящую в состав пируватдегидрогеназного комплекса) из мозга быка. В процессе очистки активность фермента снижалась и после гель-фильтрации исчезала совсем. Добавление тиаминпирофосфата и магния не активировало фермент. Как оказалось при дальнейшем исследовании, в нейтральной среде, в которой проводилось измерение ферментативной активности, тиаминпирофосфат не взаимодействовал с апоферментом. Связывание кофермента (в присутствии магния) начиналось только при рН 8 и достигало максимума при рН около 9,2—9,6. Для восстановления пируватдекарбоксилазной активности апофермента (при добавлении тиаминпирофосфата) совершенно необходимым являлось наличие в

среде фосфата. Без него активность почти не восстанавливалась.

Эффективность восстановления каталитических свойств фермента в значительной степени зависела от природы металла (без металла активация вообще отсутствовала). С одной и той же концентрацией кофермента активность с магнием в несколько раз выше, чем с кальцием.

Связь тиаминпирофосфата с апопируватдекарбоксилазой, выделенной из ткани мозга, нестабильна. Пропускание холофермента, реконструированного в присутствии избыточных концентраций тиаминпирофосфата и магния, через сефадекс даже в оптимальных условиях (рН 9,6, в присутствии фосфата) сопровождается значительным снижением активности, определяемой без добавления кофакторов. Авторы полагают [48], что крайняя нестабильность связи между апопируватдекарбоксилазой и тиаминпирофосфатом в физиологических условиях, возможно, является причиной того, что тиаминовый авитаминоз обычно наиболее остро проявляется в мозговой ткани.

## Глава восьмая

# АКТИВНЫЙ ЦЕНТР

### СТРУКТУРА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ПИРУВАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

При 180—220 нм не наблюдается различий в спектрах поглощения апо- и холопируватдекарбоксилазы пивных дрожжей. Они обнаруживаются в области 240—300 нм. Особенно отчетливо это видно в экспериментах, где снимались дифференциальные спектры (рис. 29). Из рис. 29 следует, что при образовании холофермента увеличивается поглощение при 250 нм (максимум) с одновременным уменьшением поглощения при 230—237 нм. Известно, что тиаминпирофосфат за счет своей аминопиримидиновой части имеет один из максимумов поглощения при 233 нм [518]. При смещении pH от 6,8 в кислую сторону азот, находящийся в первом положении пиримидинового кольца кофермента, протонируется и максимум сдвигается к 246 нм [351, 514]. Поэтому наличие в разностном спектре холопируватдекарбоксилазы положительного пика при 250 нм и отрицательного — при 233 нм можно объяснить сдвигом максимума поглощения кофермента в результате протонирования 1'-N-атома тиаминпирофосфата при взаимодействии последнего с апоферментом. Аналогичные изменения спектра должны наблюдаться и при образовании комплекса между магнием и 1'-N-атомом тиаминпирофосфата. В ферменте обе эти возможности (протонирование азота и взаимодействие его с магнием), по-видимому, могут реализовываться, так как характерные изменения спектра в области 230—270 нм, о которых только что говорилось, наблюдаются и в присутствии магния, и в его отсутствие, причем во втором случае величина изменений наполовину меньше [518]. Последующее добавление магния восстанавливает ту картину, которая получалась при одновременном добавлении тиаминпирофосфата и маг-

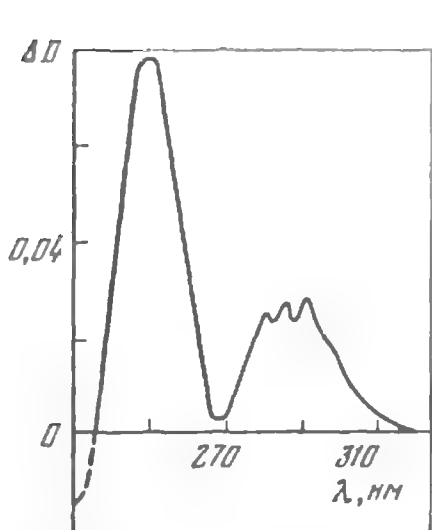


Рис. 29. Изменение спектра поглощения при взаимодействии апопируватдекарбоксилазы пивных дрожжей с тиаминпирофосфатом и магнием при pH 6,8 [518]

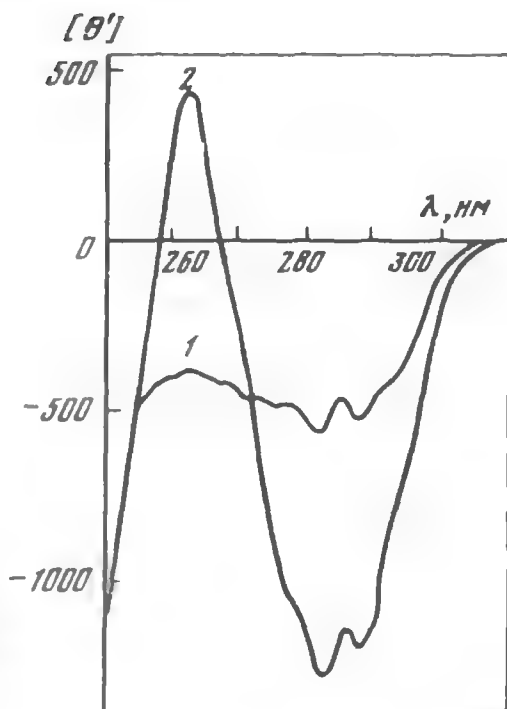


Рис. 30. Спектр циркулярного дихроизма пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей в среднем ультрафиолете [518]

1 — апофермент; 2 — холофермент

ния к апоферменту. Один магний, без кофермента, влияя на спектральную характеристику апопируватдекарбоксилазы в указанной области спектра не оказывает.

Шелленбергер, работая с тем же ферментом и исследуя взаимодействия с ним различных аналогов тиаминпирофосфата, пришел к выводу, что данный фермент имеет, как минимум, два центра связывания для кофермента (или два вида молекул апофермента), отличных один от другого [433]. Аналогичные высказывания о неравноценности участков связывания тиаминпирофосфата встречались в литературе и ранее [361]. Приведенные выше данные о влиянии магния на величину спектральных изменений, наблюдаемых при взаимодействии кофермента с апоферментом, подтверждают такую точку зрения. В далеком ультрафиолете спектры циркулярного дихроизма апо- и холопируватдекарбоксилазы практически идентичны. Можно заметить лишь небольшие различия в максимуме при 195 нм [518], что, по-видимо-

му, объясняется неодинаковой пертурбацией остатков ароматических аминокислот, которые сильно поглощают в этой области спектра. Существенные различия наблюдаются в среднем ультрафиолете (рис. 30). Апопируватдекарбоксилаза имеет отрицательный эффект Коттона в области поглощения ароматических аминокислот (кривая 1). Добавление магния и тиаминпирофосфата сопровождается увеличением эффекта Коттона почти вдвое и появлением нового, положительного эффекта Коттона при 262—263 нм (кривая 2), которого не было в апоферменте.

Известно, что тиаминпирофосфат за счет наличия в нем тиазолового кольца имеет один из максимумов поглощения при 267 нм. Молекула кофермента сама по себе оптически неактивна, но становится, по-видимому, оптически активной при взаимодействии с апоферментом, попадая в асимметричное окружение белковой молекулы. Этим можно объяснить возникновение индуцированного положительного эффекта Коттона в холопируватдекарбоксилазе при 262—263 нм. Причин несовпадения положительного максимума циркулярного дихроизма с максимумом поглощения тиазолового кольца тиаминпирофосфата может быть две. Первая — влияние сильно отрицательного максимума в области поглощения ароматических аминокислот (рис. 30, кривая 2), вторая — слабый сдвиг максимума поглощения тиаминпирофосфата при его взаимодействии с активным центром фермента.

Изменения спектра циркулярного дихроизма пируватдекарбоксилазы наблюдались только в том случае, если тиаминпирофосфат и магний добавляли к апоферменту вместе. Раздельно они никакого эффекта не давали. То же самое было показано раньше для возможности образования стабильного каталитически активного холофермента [433, 438]. Таким образом, характерные изменения спектра циркулярного дихроизма, описанные выше, отражают процесс формирования активного центра пируватдекарбоксилазы.

При взаимодействии тioxромпирофосфата с апопируватдекарбоксилазой пивных дрожжей наблюдается сдвиг максимума его флуоресценции в более короткую область спектра (рис. 31). Коротковолновый сдвиг максимума флуоресценции наблюдается и в модельной

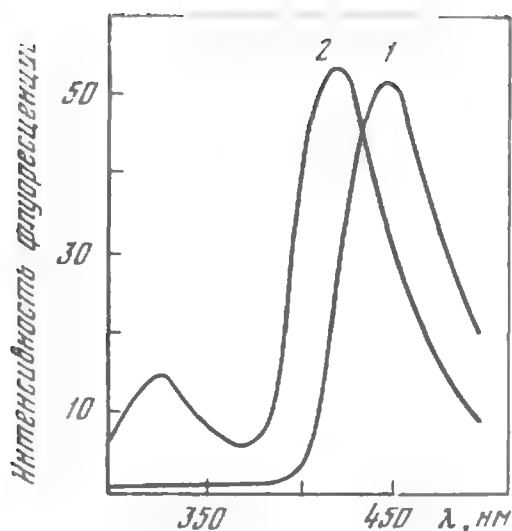


Рис. 31. Изменение спектра флуоресценции тioxромпирoфoсфaтa при eгo вaзaмoдeйcтвии c aпoпиpувaтдeкaрбoкcилaзoй пивных дрожжей в пpиcутcтвии иoнoв мaгния [554]

1 — тioxромпирoфoсфaт; 2 — aпoпиpувaтдeкaрбoкcилaзa + мaгний + тioxромпирoфoсфaт

системе при понижении диэлектрической постоянной среды, в которую помещен тioxром. Поэтому результаты, представленные на рис. 31, можно интерпретировать таким образом, что при связывании с апоферментом тioxромпирoфoсфaт пoпaдaeт из водной среды в aпoлярнoe oкpужeниe.

Аналогичные данные о гидрофобном характере активного центра пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей были получены и при использовании 2-п-толуидино-чафталин-6-сульфоновой кислоты (ТНС). Это соединение характеризуется тем, что, во-первых, имеет тенденцию связываться почти исключительно в гидрофобной области белка и, во-вторых, слабо флуоресцируя в водной среде, очень сильно флуоресцирует в аполярном окружении [148, 348, 492].

Действительно, оказалось, что флуоресценция ТНС во много раз увеличивается при добавлении пируватдекарбоксилазы, причем интенсивность флуоресценции в системе ТНС+апопируватдекарбоксилаза примерно в два раза выше, чем в системе ТНС+хол.пируватдекарбоксилаза (см. ниже).

Добавление тиаминпирoфoсфaтa и мaгния к системе ТНС+апопируватдекарбоксилаза сопровождается снижением флуоресценции в два раза [511]. Отсюда делается вполне логичное заключение, что половина всего количества ТНС, связанного с апоферментом, локализована в участке активного центра, связывающего тиаминпирoфoсфaт, или в непосредственной близости от него [511].

| Состав проб                                   | Интенсивность флуоресценции |
|-----------------------------------------------|-----------------------------|
| Апопируватдекарбоксилаза + магний + ТПФ + ТНС | 19,7                        |
| Апопируватдекарбоксилаза + ТНС                | 41,8                        |
| Апопируватдекарбоксилаза + магний + ТНС       | 41,5                        |
| Апопируватдекарбоксилаза + ТПФ + ТНС          | 42,2                        |
| Апопируватдекарбоксилаза + магний + ТПФ       | 0,5                         |
| Магний + ТПФ + ТНС                            | 1,3                         |
| Холопируватдекарбоксилаза (нативная) + ТНС    | 18,8                        |
| Холопируватдекарбоксилаза                     | 0,9                         |

При добавлении пирувата к смеси ТНС и пируватдекарбоксилазы наблюдалось резкое уменьшение интенсивности флуоресценции [511]. Создавалось впечатление, что субстрат пируватдекарбоксилазы и ТНС связываются с одним и тем же участком фермента. Действительно, в опытах, где исследовали влияние флуоресцентного индикатора на пируватдекарбоксилазную активность, был показан конкурентный характер взаимоотношений между ТНС и пируватом за субстрат-связывающий участок пируватдекарбоксилазы [511]. Гидрофобный характер субстрат-связывающего участка пируватдекарбоксилазы хорошо объясняет известный ранее факт, что многие  $\alpha$ -кетокислоты с более длинной углеродной цепочкой, чем у пирувата, имеют более высокое по сравнению с ним сродство к пируватдекарбоксилазе, хотя и декарбоксилируются с более низкой скоростью [528]: бо́льшая алкильная группа у этих субстратов характеризуется бо́льшей липофильностью, а значит, и лучше связывается в гидрофобном участке активного центра.

Исследование кинетики взаимодействия ТНС с пируватдекарбоксилазой [46] показало, что в апоферменте имеются три участка связывания флуоресцентного индикатора (рис. 32, кривая 2). Один из них связывает ТНС настолько быстро, что оказывается полностью насыщенным до того, как начинается измерение флуоресценции. Взаимодействие ТНС со вторым участком можно уже наблюдать во времени, в то время как скорость взаимодействия ТНС с третьим участком очень низкая. В холоферменте не проявляется второй участок связывания ТНС (см. рис. 32, кривая 1), который, по-видимому, является кофермент-связывающим участком молекулы пируватдекарбоксилазы. Если принять, что третий участок.

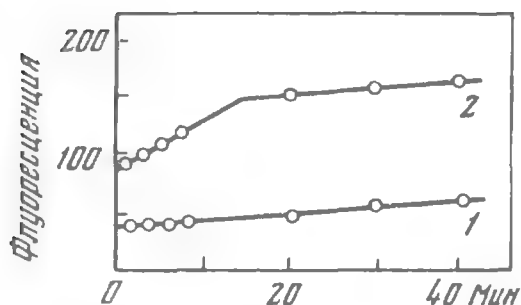


Рис. 32. Связывание ТНС препаратами пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей [46]

1 — холофермент; 2 — апофермент

наиболее медленно взаимодействующий с флуоресцентным индикатором, становится для него доступным только после обработки фермента большими концентрациями ТНС (возможно, в результате денатурации белка) [46], тогда первый, наиболее быстро взаимодействующий — это участок связывания субстрата.

Как уже указывалось выше, интенсивность флуоресценции в системе ТНС + нативная апопируватдекарбоксилаза снижается наполовину при добавлении тиаминпирофосфата. За счет добавления субстрата оставшуюся величину флуоресценции можно снизить практически до нуля [511]. Другими словами, взаимодействие данного флуоресцентного индикатора с нативной апопируватдекарбоксилазой осуществляется таким образом, что он связывается только в активном центре. Вся остальная поверхность нативного фермента, по-видимому, гидрофильна, несмотря на то, что примерно половина всех аминокислотных остатков липофильна [517].

Активный центр данного фермента представляется в виде гидрофобного кармана (или выемки), образующегося в процессе взаимодействия апофермента с тиаминпирофосфатом и магнием за счет небольших локальных изменений третичной структуры белка [508, 509, 511, 518, 555]. Гидрофобность активного центра пируватдекарбоксилазы стабилизирует связь кофермента с апоферментом, обеспечивает «вхождение» в активный центр субстрата и прикрепление последнего к белку за счет своей алкильной группы, а также предохраняет очень нуклеофильный, короткоживущий  $\alpha$ -карбанион оксиэтилтиаминпирофосфата (XVIII) — предполагаемый промежуточный продукт пируватдекарбоксилазной реакции от взаимодействия с протоном среды [130, 131, 509, 511, 555]. Протонирование  $\alpha$ -карбаниона оксиэтилтиаминпирофосфата приводило бы к образованию стабильного продук-



та (XIII), выключая тем самым  $\alpha$ -карбанион из нормального пути превращения пировиноградной кислоты.

Алкильная группа субстрата не только благоприятствует его связыванию в активном центре, но, по-видимому, необходима и на дальнейших стадиях реакции, удерживая  $\alpha$ -карбанион оксиэтилтиаминпирофосфата в гидрофобном «кармане» или повышая гидрофобность окружения этого промежуточного соединения. Другими словами — продлевает время его существования. Очевидно, именно по этой причине глиоксиловая кислота не является нормальным субстратом пируват-декарбоксилазы, как остальные  $\alpha$ -кетокислоты: хотя она и подвергается ферментативному декарбоксилированию, но продукт реакции не выделяется в среду в виде свободного формальдегида, а остается связанным с коферментом [433]. Глиоксиловая кислота не имеет алкильной группы, поэтому после обычного протекания начальной стадии декарбоксилирования образующийся  $\alpha$ -карбанион оксиметилтиаминпирофосфата, согласно вышесказанному, быстро взаимодействует с ионом водорода среды, переходя в стабильную протонированную форму [509, 515].

#### ФОРМИРОВАНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ТРАНСКЕТОЛАЗЫ

Кривая дисперсии оптического вращения апотранскетолазы, снятая в области 270—400 нм, имеет, на первый взгляд, плавный характер (рис. 33, кривая 1). Такое впечатление, однако, может быть кажущимся, так как в этой области спектра (ниже 300 нм) очень высока оптическая активность пептидных групп белковой молекулы фермента. Действительно, в спектре циркулярного дихроизма апофермента обнаруживается явно выраженный положительный эффект Коттона с максимумом при 280 нм (рис. 34).

Добавление к апотранскетолазе тиаминпирофосфата и кальция (образуется холофермент) сопровождается выявлением аномалии на кривой дисперсии оптического вращения (рис. 33, кривая 2), что соответствует усилению положительного эффекта Коттона на кривой циркулярного дихроизма (см. рис. 34). Кальций сам по себе,

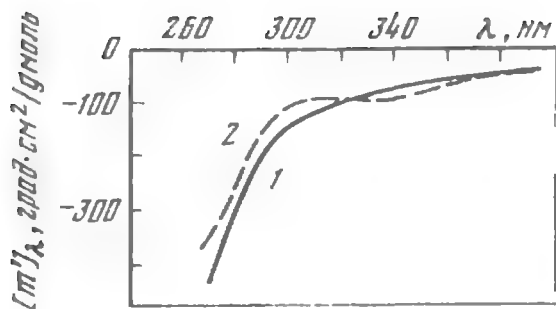


Рис. 33. Спектр дисперсии оптического вращения транскетолазы в  $1 \cdot 10^{-2}$  М трис-буфере pH 6,5 [282]

1 — апофермент; 2 — холофермент

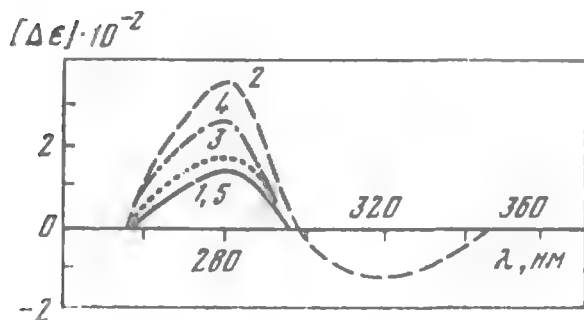


Рис. 34. Изменение спектра циркулярного дихроизма апотранскетолазы при добавлении тиаминпирофосфата и его аналогов [27]

1 — апофермент; 2 — холофермент; 3 — апофермент + тиамин; 4 — апофермент + тиаминмонофосфат; 5 — апофермент + тиазолпирофосфат. Условия, как на рис. 33

без кофермента, влияния на оптическую активность транскетолазы в исследуемой области спектра не оказывал.

Для многих белков показано, что эффекты Коттона, обнаруживаемые в области 260—300 нм, обусловлены наличием в белковой молекуле остатков триптофана и тирозина (оптическая активность дисульфидных связей проявляется обычно в более коротковолновой области спектра) [91].

Таким образом, положительный эффект Коттона с максимумом при 280 нм обусловлен наличием в молекуле транскетолазы остатка (или остатков) ароматической аминокислоты, являющейся центром асимметрии. При добавлении кофермента он лишь усиливается, в то время как общая форма пика циркулярного дихроизма и положение его максимума остаются по существу неизменными (сравни кривые для апо- и холофермента на рис. 34).

В спектре циркулярного дихроизма холофермента наряду с положительным эффектом Коттона, который был и в апоферменте, обнаруживается еще отрицательный эффект Коттона, которого в апоферменте не было (см. рис. 34). Его максимум находится при 320 нм, где ни кофермент, ни апофермент не имеют полос поглощения.

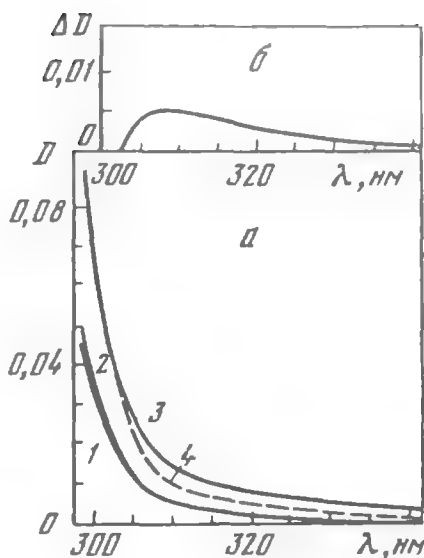
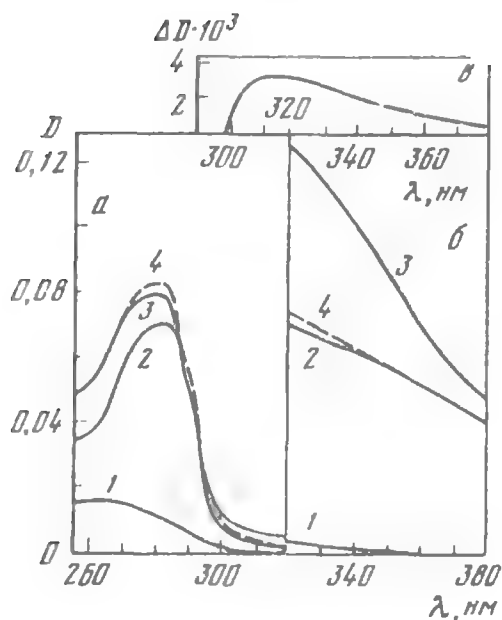


Рис. 35. Спектры поглощения апотранскетолазы, тиаминпирофосфата (ТПФ) и их смеси в  $1 \cdot 10^{-2}$  М трис-буфере, pH 6,5 [281]

а: 1 — ТПФ ( $1 \cdot 10^{-3}$  М), 2 — апофермент ( $1,8 \cdot 10^{-2}$  М) + кальций ( $1 \cdot 10^{-3}$  М), 3 — апофермент ( $1,8 \cdot 10^{-2}$  М) + кальций ( $1 \cdot 10^{-3}$  М) + ТПФ ( $1 \cdot 10^{-3}$  М), 4 — алгебраическая сумма кривых 1 и 2. Кювета — 2 мм; б: 1 — ТПФ ( $1,7 \cdot 10^{-4}$  М), 2 — апофермент ( $1,1 \cdot 10^{-5}$  М) + кальций ( $1 \cdot 10^{-3}$  М), 3 — апофермент ( $1,1 \cdot 10^{-5}$  М) + кальций ( $1 \cdot 10^{-3}$  М) + ТПФ ( $1,7 \cdot 10^{-4}$  М), 4 — алгебраическая сумма кривых 1 и 2. Кювета — 10 мм; а: разностный спектр, полученный путем вычитания кривой 4 из кривой 3

Рис. 36. Спектры поглощения триптофана, тиаминпирофосфата и их смеси [281]

а: 1 — триптофан ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  М), 2 — тиаминпирофосфат ( $4 \cdot 10^{-4}$  М), 3 — триптофан ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  М) + тиаминпирофосфат ( $4 \cdot 10^{-4}$  М), 4 — алгебраическая сумма кривых 1 и 2. Кювета — 2 мм, б: разностный спектр, полученный путем вычитания кривой 4 из кривой 3. Условия те же, что на рис. 35

Таким образом, отрицательный эффект Коттона возникает только при взаимодействии кофермента с апотранскетолазой и обусловлен, по-видимому, появлением центра асимметрии в результате образования одной из связей тиаминпирофосфата с апоферментом (сам тиаминпирофосфат оптической активности не имеет).

На рис. 35, а, б изображены спектры поглощения соответственно тиаминпирофосфата (кривая 1), апотранскетолазы (кривая 2) и холотранскетолазы (кривая 3) в интервале 255—380 нм и, кроме того, приведена кривая,

являющаяся алгебранческой суммой кривых для тиамина-пирофосфата и апотранскетолазы (кривая 4). Разностный спектр изображен на рис. 35, в. Видно, что в результате взаимодействия с коферментом поглощение апотранскетолазы в области 298—380 нм увеличивается.

Аналогичные изменения наблюдались и в модельной системе при взаимодействии тиаминапирофосфата со свободным триптофаном (рис. 36). При замене триптофана другими аминокислотами — тирозином, фенилаланином или гистидином, взятыми в разной концентрации и в различных соотношениях с тиаминапирофосфатом, никаких изменений в спектрах поглощения не было обнаружено [63, 281]. Взаимодействие тиаминапирофосфата с триптофаном (но не с другими аминокислотами) в модельной системе было показано также методом циркулярного дихроизма [215] и ядерно-магнитного резонанса [92, 353, 422].

Таким образом, в обоих случаях — и в модельной системе (тиаминапирофосфат+триптофан) и в опытах с ферментом (тиаминапирофосфат+апотранскетолаза) — отмечается появление новой полосы поглощения, которой не было у исходных компонентов и которая возникает при их взаимодействии. Эта полоса (см. рис. 35, в и 36, б) имеет диффузный характер, нечеткий максимум поглощения и длинный «хвост», простирающийся в видимую область спектра.

Исходя из литературных данных, полученных с НАД-зависимыми ферментами, а также в модельных системах с такими коферментами, как НАД, ФМН и ФАД [13, 57, 124, 365, 398, 472], можно считать, что характерные изменения спектра, наблюдавшиеся в системе апотранскетолаза+тиаминапирофосфат (аналогичные изменениям спектра в модельной системе триптофан+тиаминапирофосфат), отражают образование комплекса с переносом заряда при взаимодействии тиаминапирофосфата с апотранскетолазой. Функцию донора в этом комплексе выполняет индолильная группа остатка триптофана белка, а функцию акцептора — молекула тиаминапирофосфата. Все это указывает на то, что наряду с остатком гистидина (о чем говорилось выше) одной из функциональных групп, входящих в состав активного центра транскетолазы и участвующих в присоединении тиаминапирофосфата к апоферменту, является остаток триптофана. Дан-

ное заключение нашло подтверждение в работе Хайнриха и сотр. [213], показавших, что модификация двух остатков триптофана в молекуле апотранскетолазы сопровождается инактивацией фермента. Каталитическая активность холотранскетолазы в тех же условиях оставалась неизменной; не нарушалась и целостность остатков триптофана.

При исследовании в модельных системах методом ядерно-магнитного резонанса было показано [92, 354], что необходимое условие образования комплекса между свободным триптофаном (или различными индолилпроизводными) и тиаминпирофосфатом — наличие в молекуле кофермента положительно заряженного азота тиазолового кольца. Аналоги тиаминпирофосфата, в которых азот в третьем положении тиазолового кольца был лишен положительного заряда, теряли способность взаимодействовать с триптофаном. Пиримидиновое кольцо тиаминпирофосфата, имеющее в сильно кислой среде (рН 3,0) положительно заряженный азот, стоящий в первом положении, взаимодействовало с триптофаном. При более высоких значениях рН взаимодействие было, однако, слабым и основной вклад во взаимодействие тиаминпирофосфата с триптофаном давало положительно заряженное тиазоловое кольцо. Пирофосфатный остаток лишь незначительно влиял на образование комплекса тиаминпирофосфат — триптофан, и свободный тиамин взаимодействовал с триптофаном практически так же, как и его пирофосфорилированное производное.

Для выяснения условий образования комплекса с переносом заряда в процессе присоединения кофермента к апотранскетолазе были исследованы изменения спектра циркулярного дихроизма апофермента при его взаимодействии с различными аналогами тиаминпирофосфата и сопоставлены с изменениями, характерными для холофермента. Все опыты, как и предыдущие, ставили в присутствии кальция. Отметим, что все исследованные аналоги кофермента, так же как и тиаминпирофосфат, были оптически неактивны.

Усиление положительного эффекта Коттона в спектре циркулярного дихроизма апотранскетолазы наблюдаются (показано на рис. 34) не только при добавлении тиаминпирофосфата, о чем уже говорилось выше, но и при добавлении тиаминмонофосфата или тиамина, т. е.

наличие пирофосфатной группы в данном случае необязательно. Но обязательным является наличие положительно заряженного азота в третьем положении тиазолового кольца или пиримидиновой части молекулы кофермента (возможно — и того и другого одновременно), так как тиазолпирофосфат (V) изменений в спектре циркулярного дихроизма не вызывает (см. рис. 34).

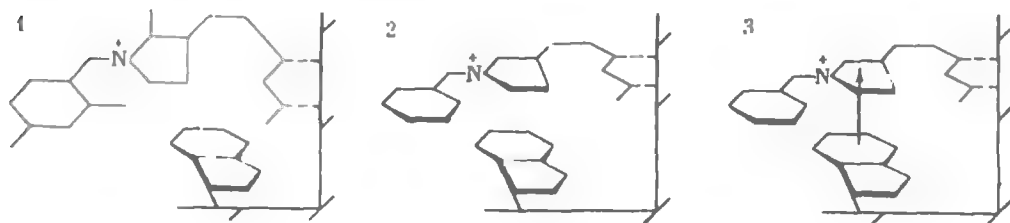
Ни один из исследованных аналогов тиаминпирофосфата, взаимодействуя с апотранскетолазой, не вызывал появления отрицательного эффекта Коттона, как это имеет место в случае взаимодействия кофермента с апотранскетолазой (см. рис. 34). Другими словами, комплекс с переносом заряда не образовывался. Для его образования в модельной системе тиаминпирофосфат + триптофан необходимо наличие положительно заряженного азота тиазолового кольца тиаминпирофосфата. В опытах с ферментом это тоже подтверждается — тиазолпирофосфат, в котором положительный заряд на азоте отсутствует, действительно не образует с апотранскетолазой комплекс с переносом заряда, хотя и достаточно прочно связывается с молекулой белка. С другой стороны, тиамин и тиаминмонофосфат, которые содержат положительно заряженное тиазоловое кольцо, тем не менее также не образуют комплекс с переносом заряда с апотранскетолазой. В модельной же системе с триптофаном они образовывали комплекс, причем в такой же степени, как и тиаминпирофосфат.

Таким образом, для образования комплекса с переносом заряда в условиях фермента необходимо не только положительно заряженное тиазоловое кольцо, но и пирофосфатный остаток (свободный пирофосфат влияния на оптическую активность апотранскетолазы не оказывает).

Считается, что образование комплекса с переносом заряда возможно только в том случае, если ароматические кольца обоих компонентов параллельны и расположены в непосредственной близости [57]. Исходя из экспериментальных данных, полученных с аналогами тиаминпирофосфата, можно следующим образом представить себе последовательность отдельных стадий процесса образования комплекса с переносом заряда при взаимодействии кофермента с апотранскетолазой.

На первой стадии тиаминпирофосфат взаимодействует с апоферментом за счет своего пирофосфатного остат-

ка (возможно, что отдельные фосфатные остатки тиаминпирофосфата присоединяются к молекуле белка последовательно, но в данном случае это не меняет дела). В результате этого происходит сближение положительно заряженного тиазолового кольца кофермента с индолильной группой остатка триптофана в активном центре и их соответствующая ориентация (вторая стадия). Вследствие этого становится возможным их взаимодействие и происходит образование комплекса с переносом заряда (третья стадия) [27].



Приводя данную схему, мы хотели лишь подчеркнуть определяющую роль пирофосфатного остатка тиаминпирофосфата для (или в процессе) образования комплекса с переносом заряда. Она заключается не только в том, что пирофосфатный остаток обеспечивает прочное («квазинеобратимое») присоединение кофермента к молекуле белка и сближение взаимодействующих компонентов комплекса с переносом заряда — положительно заряженного тиазолового кольца и индолильной группы остатка триптофана<sup>1</sup>. Пирофосфатный остаток тиаминпирофосфата, по-видимому, обеспечивает еще и соответствующую ориентацию индолильной группы остатка триптофана, стабилизируя (или локально изменяя) определенную конформацию активного центра транскетолазы. Это положение находится в соответствии с экспериментальными данными, о которых говорилось выше, а именно — тиаминпирофосфат существенно стабилизирует

<sup>1</sup> Аналогичную функцию мог бы выполнять фосфатный остаток тиаминмонофосфата, при участии которого происходит связывание тиаминмонофосфата с апотранскетолазой и который вносит существенный вклад во взаимодействие этого аналога с активным центром фермента (константа связывания для тиаминмонофосфата примерно на три порядка больше, чем для не фосфорилированного тиамина). Тем не менее связывание тиаминмонофосфата с апотранскетолазой не сопровождается образованием комплекса с переносом заряда.

активный центр транскетолазы в процессе ее тепловой и кислотной денатурации (см. главу VI). Аналогичную функцию стабилизатора, хотя выраженную в меньшей степени, выполнял и свободный пирофосфат (эти данные получены при исследовании тепловой инактивации апотранскетолазы), в то время как в присутствии тиаминамонофосфата никакой стабилизации не наблюдалось — фермент инактивировался в такой же степени, как и в отсутствие тиаминамонофосфата.

Как уже указывалось выше, комплекс с переносом заряда образуется только в системе тиаминпирофосфат+апотранскетолаза. Ни один из исследованных аналогов кофермента, взаимодействуя с апоферментом, не дает образования комплекса с переносом заряда. В то же время все эти аналоги, хотя и связываются с апотранскетолазой, каталитическую функцию не выполняют. Отсюда вытекало предположение, что комплекс с переносом заряда играет определенную роль в осуществлении ферментативной реакции, катализируемой транскетолазой. Вопрос этот был экспериментально исследован [284].

Дифференциальный спектр холотранскетолазы изображен на рис. 37 (кривая 1). Снимался он с использованием четырех кювет. В две из них помещали соответственно апотранскетолазу+тиаминпирофосфат в буфере и раствор буфера, а в две другие — соответственно апотранскетолазу в буфере и тиаминпирофосфат в буфере. Полученный дифференциальный спектр отражал, таким образом, те изменения в поглощении, которые возникали в результате взаимодействия кофермента с апоферментом.

Как видно из данных рис. 37 (кривая 1), дифференциальный спектр холотранскетолазы характеризуется наличием широкой полосы поглощения в области 286—360 нм с нечетко выраженным максимумом при 300—310 нм и плечом при 286—292 нм, отрицательного пика с максимумом около 270 нм и положительного пика с максимумом примерно при 248 нм. Широкая полоса поглощения при 286—360 нм является результатом образования комплекса с переносом заряда при взаимодействии тиаминпирофосфата с апотранскетолазой и соответствует отрицательной полосе в спектре циркулярного дихроизма холотранскетолазы, о чем говорилось выше (см.



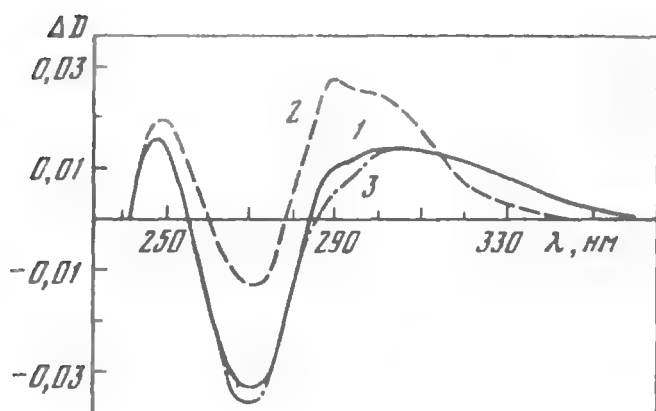


Рис. 37. Дифференциальные спектры поглощения холотранскетолазы и ее комплекса с оксипируватом [284]

1 — холотранскетолаза ( $4,4 \cdot 10^{-6}$  М); 2 — то же, что и 1, но через 2 мин после добавления оксипирувата ( $2,8 \cdot 10^{-5}$  М); 3 — то же, что и 2, но после добавления гликолевого альдегида ( $4,3 \cdot 10^{-3}$  М)

рис. 34). Плечо при 286—292 нм объясняется, по-видимому, наложением спектра пертурбации остатков триптофана (красный сдвиг полосы поглощения триптофана) на основной спектр комплекса с переносом заряда. Что касается отрицательного пика с максимумом около 270 нм, то, по аналогии с другим тиаминовым ферментом — пируватдекарбоксилазой [518], можно считать причиной его появления гипохромизм тиазолового кольца тиаминпирофосфата в результате присоединения кофермента к молекуле апотранскетолазы (в условиях постановки эксперимента — рН 7,6, тиазоловое кольцо кофермента имеет максимум поглощения при 267—269 нм [291, 514]).

Добавление одного из субстратов-доноров транскетолазы — оксипирувата сопровождается существенными изменениями дифференциального спектра холотранскетолазы: уменьшается интенсивность широкой полосы поглощения в области 315—360 нм и величина отрицательного пика с максимумом при 270 нм (рис. 37, кривая 2). Аналогичные изменения дифференциального спектра холотранскетолазы наблюдались и в том случае, когда вместо оксипирувата добавляли другой субстрат-донор — фруктозо-6-фосфат. Изменения не наблюдались, когда к холотранскетолазе добавляли субстрат-акцептор — рибозо-5-фосфат. Если сразу же после добавления оксипирувата добавить субстрат-акцептор — гликолевый альдегид

(или глюкозо-6-фосфат), то исходный спектр восстанавливается (рис. 37, кривая 3). Если субстрат-донор и субстрат-акцептор добавляются к холотранскетолазе одновременно, изменений дифференциального спектра не наблюдалось.

Изменения в указанных областях спектра при добавлении оксипирувата происходили одновременно. Очевидно, они являются отражением одного и того же процесса — образования тройного комплекса транскетолаза — тиаминпирофосфат — субстрат или транскетолаза — тиаминпирофосфат — «активный гликольальдегид».

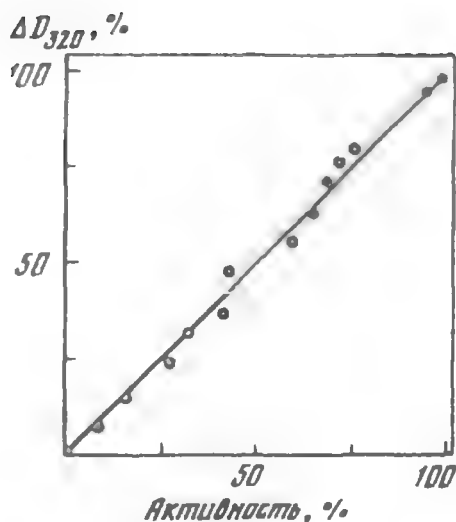
Как мы уже говорили выше, появление в дифференциальном спектре холотранскетолазы отрицательного пика с максимумом при 270 нм обусловлено, по-видимому, гипохроизмом тиазолового кольца тиаминпирофосфата при связывании кофермента с апотранскетолазой. Известно также, что субстраты-доноры (в том числе и оксипируват) в процессе транскетолазной реакции присоединяются к тиаминпирофосфату по второму углеродному атому тиазолового кольца кофермента (см. главу II). Можно поэтому полагать, что величина изменения оптической плотности при 270 нм при добавлении оксипирувата к холотранскетолазе отражает концентрацию тройного комплекса в системе.

Что касается изменений спектра холотранскетолазы в области поглощения комплекса с переносом заряда (см. рис. 37), то здесь следует сказать следующее. Как уже отмечалось выше, для образования комплекса с переносом заряда необходимо близкое расположение взаимодействующих компонентов комплекса и соответствующее, достаточно строгое, их расположение друг относительно друга. Кроме того, в рассматриваемом нами случае необходимо еще наличие положительно заряженного атома азота тиазолового кольца тиаминпирофосфата — одного из компонентов, образующих комплекс. Естественно, что такая тонкая структура будет весьма чувствительна даже к небольшим изменениям каждого из компонентов комплекса, что должно проявляться в изменении его спектральных свойств.

Поэтому уменьшение интенсивности спектра комплекса с переносом заряда, наблюдавшееся при взаимодействии оксипирувата с холотранскетолазой (а точнее — со вторым углеродным атомом тиазолового кольца ти-

Рис. 38. Зависимость между величиной транскетолазной активности и изменением оптической плотности при связывании тиаминпирофосфата (ТПФ) апотранскетолазой в присутствии кальция ( $2,3 \cdot 10^{-3}$ ) [279]

Исходная концентрация апотранскетолазы —  $3,57 \cdot 10^{-6}$  М; исходная концентрация ТПФ —  $2,6 \cdot 10^{-6}$  —  $1,4 \cdot 10^{-4}$  М



аминпирофосфата в составе холофермента) могло быть вызвано нарушением взаимной ориентации взаимодействующих компонентов, изменением электронно-акцепторных свойств тиазолового кольца кофермента или образованием долгоживущего промежуточного комплекса, лишённого положительного заряда на атоме азота тиазолового кольца [110].

В настоящее время трудно сказать, какая из трех указанных возможностей реализуется в действительности. Ясно лишь то, что структура, образующаяся при взаимодействии тиаминпирофосфата с апотранскетолазой и характеризующаяся спектром комплекса с переносом заряда, является характеристикой активного центра фермента, а наблюдаемые в присутствии субстрата-донора изменения в этом спектре есть результат ферментативной реакции, катализируемой транскетолазой.

Первое положение (а косвенно и второе) подтверждается экспериментальными данными, приведенными на рис. 38. Здесь по оси абсцисс отложена величина ферментативной активности реконструируемой транскетолазы, определяемой в отсутствие добавленных извне кофакторов (она отражает связывание каталитически активных молекул кофермента), а по оси ординат — соответствующее изменение величины оптической плотности при 320 нм, характеризующее образование комплекса с переносом заряда. Из рис. 38 видно, что между указанными величинами наблюдается четкая линейная зависимость,

и при максимальной активности реконструированного холофермента изменение оптической плотности также максимально.

Как будет показано дальше, с молекулой апотранскетолазы способно связываться относительно большое количество молекул тиаминпирофосфата, причем только часть из них выполняет каталитическую функцию. Экспериментальные данные, приведенные на рис. 38, указывают на то, что комплекс с переносом заряда образуется только при связывании апоферментом каталитически активных молекул кофермента. Другими словами, его образование характеризует формирование активного центра транскетолазы.

## КОЛИЧЕСТВО АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ

### *Транскетолаза из листьев шпината*

Тиаминпирофосфат в данном случае связан прочно и не отщепляется в процессе выделения и очистки фермента. Гомогенные препараты нативного фермента не активируются добавленными извне кофакторами и содержат один моль кофермента на моль белка [246, 250], другими словами — имеют один активный центр.

### *Транскетолаза пекарских дрожжей*

Кофермент от транскетолазы пекарских дрожжей частично отщепляется уже в процессе выделения и очистки фермента [193]. Поэтому изучение связывания тиаминпирофосфата обычно проводят с препаратами фермента, предварительно разобщенными от кофермента.

Опыты по связыванию тиаминпирофосфата с транскетолазой в равновесных условиях ставили на колонках, заполненных ссфадексом G-50. Для уравнивания использовали калий-фосфатный буфер (рН 7,6), содержащий кальций или магний — в насыщающей концентрации и кофермент — в различных концентрациях [288].

Судя по данным рис. 39, а, на котором изображены результаты экспериментов, полученных в присутствии кальция, в молекуле транскетолазы имеются два участка связывания для тиаминпирофосфата, характеризующие-

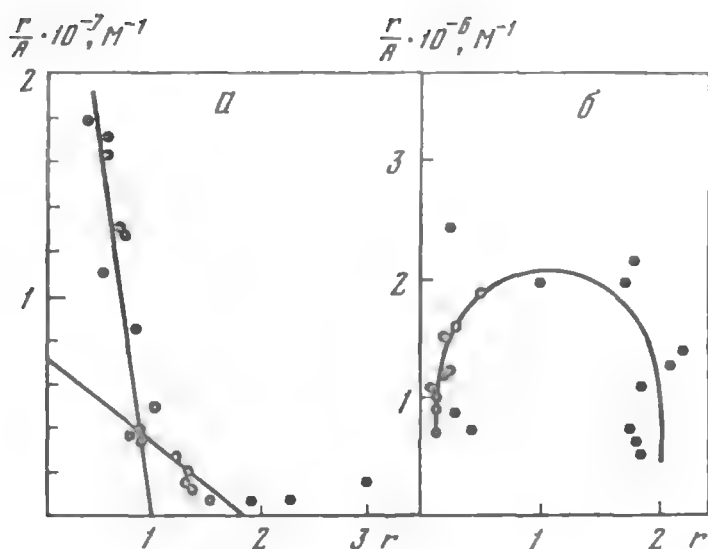


Рис. 39. Связывание тиаминпирофосфата с апотранскетолазой в присутствии кальция (а) и магния (б) [288]

$r$  — число молей тиаминпирофосфата, связанное с молем фермента;  $A$  — концентрация свободного кофермента в среде

ся достаточно низкими значениями константы диссоциации (соответственно  $3,2 \cdot 10^{-8} M$  и  $2,5 \cdot 10^{-7} M$ ). При достаточно высоких концентрациях кофермента с молекулой транскетолазы может дополнительно связываться еще несколько молекул тиаминпирофосфата, но сродство их к ферменту значительно ниже, чем первых двух.

Если связывание тиаминпирофосфата с апотранскетолазой происходило в присутствии магния (рис. 39, б), то также можно было говорить о наличии двух «основных» участков связывания кофермента. Зависимость  $r/A$  от  $r$  в данном случае имела куполообразный характер, что указывало на положительное кооперативное взаимодействие между этими участками [125].

Для исследования «квазинеобратимого» связывания тиаминпирофосфата препараты апотранскетолазы преинкубировали с тиаминпирофосфатом и кальцием или магнием, взятыми в насыщающей концентрации. Затем пропускали через сефадекс G-50 для удаления свободных кофакторов и в ферментном препарате, снятом с колонки, измеряли содержание тиаминпирофосфата. Кроме того, для определения степени реконструкции холотранскетолазы измеряли величину ферментативной активно-

сти без добавления кофакторов и с добавлением тиаминпирофосфата и, соответственно, кальция или магния (в зависимости от того, с каким из указанных катионов проводили предварительную инкубацию) [32].

После реконструкции холотранскетолазы в присутствии кальция ее каталитическая активность одинакова как при определении с добавлением кофакторов, так и без них. Количество тиаминпирофосфата составляет 1,6 моля на моль фермента. Очевидно, что максимальное количество тиаминпирофосфата, которое в данных условиях проведения эксперимента связывается «квази необратимо» с апотранскетолазой и которое необходимо для проявления полной каталитической активности фермента, равно двум. Аналогичные данные были получены при реконструкции холотранскетолазы в присутствии магния [32, 210].

Приведенные выше эксперименты не давали ответа на вопрос о количестве активных центров в молекуле транскетолазы, так как не было известно, все ли молекулы кофермента, связавшись с белком, выполняют каталитическую функцию. Этот вопрос пытались разрешить в лаборатории Рекера [135]. Транскетолазу инкубировали с равномерно меченным по углероду фруктозо-6-фосфатом в присутствии тиаминпирофосфата и магния, взятыми в насыщающих концентрациях. Инкубационную смесь пропускали через анионообменник для удаления фруктозо-6-фосфата, не вступившего в реакцию. Фермент оставался в элюате. Он содержал связанный с тиаминпирофосфатом гликольальдегид, образовавшийся из фруктово-6-фосфата. После депротеинизации определяли количественное содержание кофермента и гликольальдегида. Оказалось, что на моль фермента обнаруживается два эквивалента тиаминпирофосфата и 0,6 эквивалента гликольальдегида, т. е. соотношение фермент : кофермент : гликольальдегид равно  $1 : 2 : 0,6$ . Таким образом, какая-то часть гликольальдегида отщепляется от холофермента в процессе проведения эксперимента. Но какая часть, сказать трудно, а значит и вопрос о количестве активных центров в молекуле транскетолазы пекарских дрожжей оставался открытым.

Более плодотворным оказался подход, основанный на том, что характерные изменения спектра поглощения с максимумом при 320 нм наблюдаются при связывании с

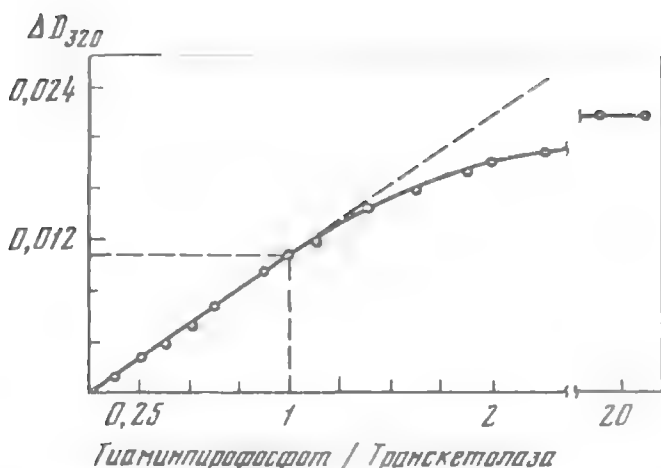


Рис. 10. Титрование апотранскетолазы тиаминпирофосфатом в присутствии кальция [279]

По оси ординат — изменение оптической плотности при 320 нм. По оси абсцисс — количество молей тиаминпирофосфата, добавленных в пробу, на моль апофермента. Концентрация белка —  $3,57 \cdot 10^{-6}$  М

апотранскетолазой только тех молекул тиаминпирофосфата, которые, связавшись с белком, обладают каталитической активностью (см. стр. 149). При этом исходили из того, что кофермент в присутствии кальция характеризуется достаточно высоким сродством к апоферменту (см. стр. 151). На рис. 40 изображена кривая титрования апотранскетолазы тиаминпирофосфатом. При низкой концентрации кофермента наблюдается линейная зависимость между изменением оптической плотности при 320 нм и количеством добавленного тиаминпирофосфата. В этих условиях кофермент связывается с белком полностью, и при связывании одного моля тиаминпирофосфата на моль фермента изменение оптической плотности составляет 50% от максимального. Отсюда можно сделать вывод о наличии в транскетолазе двух активных центров, что хорошо согласуется с тем, что молекула фермента состоит из двух идентичных субъединиц.

При достаточно высоких концентрациях тиаминпирофосфата, когда с молем белка связывается больше одного моля кофермента, линейность графика нарушается (см. рис. 40). Это находится в соответствии с различными величинами константы ассоциации для двух участков связывания — они различаются примерно на порядок.

Попытки реконструировать холодтранскетолазу из апотранскетолазы, лишенной кальция и тиаминпирофосфата в среде, не содержавшей двухвалентных катионов, успеха не имели [32]. Следовательно, для образования холофермента из апо- и кофермента наличие двухвалентных катионов является обязательным. Так как в нативном холоферменте обнаружен только кальций, то «истинным» кофактором транскетолазы следует считать именно этот металл, а не магний, как думали раньше.

### *Другие тиаминовые ферменты*

В высокоочищенных препаратах пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей обнаружено три моля тиаминпирофосфата на моль белка. Такой фермент частично разобщен от кофермента и активируется примерно на 30% при добавлении тиаминпирофосфата и магния в насыщающих концентрациях [516]. На основании полученных экспериментальных данных авторы выдвигают предположение о том, что нативный холофермент имеет четыре активных центра, с одним из которых кофермент связан менее прочно и отщепляется в процессе выделения и очистки пируватдекарбоксилазы.

Предположение о наличии четырех активных центров в молекуле вышеуказанного фермента получило подтверждение в лаборатории Шелленбергера [507]. Авторы в своих опытах использовали в качестве субстрата меченную по углероду глиоксиловую кислоту. Специфика этого субстрата заключается в том, что его ферментативное превращение под действием пируватдекарбоксилазы останавливается на стадии отщепления  $\text{CO}_2$ . Образующийся на данной стадии реакции промежуточный продукт (очевидно, оксиметил) остается прочно связанным с тиаминпирофосфатом, лишая тем самым кофермент его каталитических свойств. В этих условиях на каждый моль холопируватдекарбоксилазы выделялось четыре моля углекислого газа.

В пируватдекарбоксилазе пируватдегидрогеназного комплекса *E. coli* на основании результатов измерения величины коэффициента Хилла предполагается наличие двух субстрат-связывающих участков на молекулу фермента [457].



Пируватдекарбоксилаза пируватдегидрогеназного комплекса сердца свиньи связывает одну молекулу тиаминпирофосфата в присутствии кальция и две молекулы — в его отсутствие [294]. Никаких экспериментальных данных при этом не приводится, и поэтому неясно, обе ли молекулы кофермента во втором случае выполняют каталитическую функцию.

Таким образом, сведения о количестве активных центров в тиаминовых ферментах немногочисленны и в ряде случаев недостаточно полные. С уверенностью можно говорить лишь о транскетолазе, выделенной из пекарских дрожжей и листьев шпината, а также о пируватдекарбоксилазе пивных дрожжей. В первом случае фермент, состоящий из двух субъединиц, имеет два активных центра. Во втором случае в нативном холоферменте, состоящем из одной полипептидной цепи и максимально активном без добавления извне кофакторов, обнаружена одна молекула кофермента. В третьем — на две субъединицы приходится, очевидно, четыре каталитически активных молекулы тиаминпирофосфата.

## Глава девятая

### РЕГУЛЯЦИЯ

#### ПИРУВАТДЕКАРБОКСИЛАЗА

При достаточно высоких концентрациях пирувата, которые обычно использовали при исследовании пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей, зависимость скорости реакции от концентрации субстрата выражалась гиперболической кривой [233, 240]. С низкими концентрациями пирувата кривая приобретала вид сигмoиды, что отчетливо видно из результатов, представленных на рис. 11. Изображение полученных данных в обратных величинах дает прямую линию лишь в области высоких концентраций субстрата. Полное спрямление кривой получается в том случае, когда по абсциссе вместо  $1/[S]$  откладывается  $1/[S]^2$ , что указывает на наличие в молекуле фермента по крайней мере двух участков связывания для пирувата. Такой вывод подтверждается и при определении коэффициента Хилла, который оказался равным 1,7—1,8 (рис. 42, кривая 1).

Препараты пируватдекарбоксилазы, выделенные из различных порций пивных дрожжей, как правило, имеют неодинаковую удельную активность. Отличаются они и по свойствам. На рис. 42 кривая 1 получена на основании опытов, проведенных с высокоочищенным ферментом (уд. активность 80 Е/мг белка). Кривая 2 получена с менее активным препаратом (уд. активность 45—50 Е/мг белка). В последнем случае коэффициент Хилла равен примерно 2 лишь при использовании относительно низких концентраций субстрата. В области относительно высоких концентраций он снижается до 0,9. Резкий перегиб кривой наблюдается при концентрации пирувата, равной  $3 \cdot 10^{-3}$  М (рис. 42, кривая 2).

Авторы [510] полагают, что неодинаковые свойства различных препаратов пируватдекарбоксилазы могут

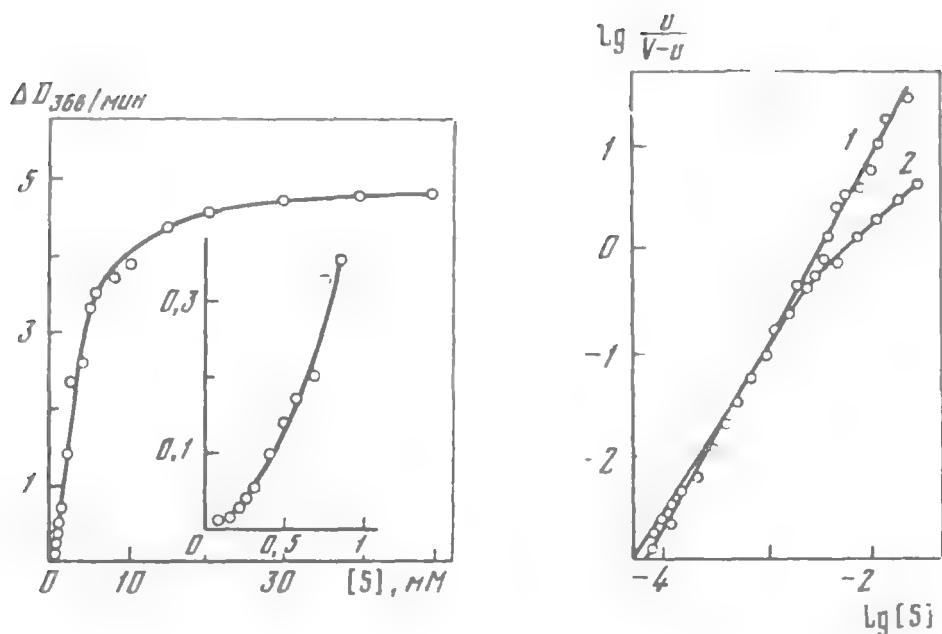


Рис. 41. Зависимость скорости пируватдекарбоксилазной реакции от концентрации субстрата [510]

Рис. 42. Зависимость скорости пируватдекарбоксилазной реакции от концентрации пирувата (данные представлены в координатах Хилла) [510]

1 — ферментный препарат с высокой удельной активностью; 2 — ферментный препарат с невысокой удельной активностью

быть объяснены различными условиями выращивания отдельных порций дрожжей, из которых эти препараты фермента выделяли. Такое заключение делается по аналогии с литературными данными [191], сущность которых сводится к следующему. Коэффициент Хилла для цитоплазматической пируватдекарбоксилазы *E. coli* равен 1,9, если бактерии выращивали в среде, содержащей магний в высокой концентрации ( $1 \cdot 10^{-3}$  М). При низком содержании магния в среде выращивания ( $3 \cdot 10^{-6}$  М) коэффициент Хилла равнялся 0,9. Та же величина определялась и в том случае, если бактериальные клетки, выращенные на среде с высоким содержанием магния, перед исследованием подвергали тепловой обработке.

В какой степени можно проводить аналогию между дрожжами и клетками *E. coli* — покажут дальнейшие исследования.

Наличие, как минимум, двух участков связывания субстрата в молекуле пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей показано и в лаборатории Хесса [96]. Величина коэффициента Хилла была определена равной 1,37 при использовании пирувата в широком диапазоне концентраций, независимо от того, проводилась ли работа с дрожжевыми экстрактами или с очищенными препаратами фермента. Степень кооперативности, однако, резко изменялась в присутствии неорганического фосфата. При его концентрации, равной  $2,5 \cdot 10^{-2}$  М и  $1 \cdot 10^{-1}$  М, коэффициент Хилла увеличивался соответственно до 1,9 и 2,13. Увеличивалась и величина константы Михаэлиса для пирувата: от  $1,3 \cdot 10^{-3}$  М в отсутствие фосфата, до  $1,1 \cdot 10^{-2}$  М при его концентрации, равной  $1 \cdot 10^{-1}$  М. Таким образом, сродство субстрата к ферменту уменьшалось почти на порядок. Максимальная скорость реакции при этом не изменялась [96].

Интересно заметить, что константа ингибирования для фосфата равна  $2,5 \cdot 10^{-3}$  М [96] — величина того же порядка, что и  $K_m$  для пирувата ( $1,3 \cdot 10^{-3}$  М). Примерно одинаковое сродство пируватдекарбоксилазы к субстрату и к ингибитору (концентрация которого в клетке подвержена резким изменениям в зависимости от интенсивности и направленности различных ферментативных процессов) может указывать на возможные пути регуляции данного фермента в дрожжах.

В противоположность фосфату амид пировиноградной кислоты повышает в условиях низкой концентрации субстрата пируватдекарбоксилазную активность [252, 434, 435]. Он уменьшает степень сигмоидальности кривой зависимости величины активности пируватдекарбоксилазы от концентрации пирувата, приближая ее к гиперболической форме. Аналогичное влияние, хотя и в меньшей степени выраженное, оказывает амид  $\alpha$ -кетомасляной кислоты.

Ни одно из указанных соединений не является ни субстратом пируватдекарбоксилазы, ни конкурентным ингибитором. Авторы полагают, что в молекуле пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей наряду с активным центром имеется регуляторный центр, взаимодействие с которым и дает те изменения ферментативной активности, о которых говорилось выше.

## ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНЫЙ КОМПЛЕКС ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ

### *Пировиноградная кислота как эффектор в пируватдегидрогеназной реакции*

При относительно низких концентрациях пирувата зависимость скорости ферментативной реакции, катализируемой пируватдегидрогеназным комплексом, выделенным из грудной мышцы голубя, от концентрации субстрата не подчиняется закону Михаэлиса-Ментен. Кривая имеет S-образную форму [52], что свидетельствует об аллостерических взаимоотношениях между центрами связывания пирувата пируватдегидрогеназным комплексом. Коэффициент Хилла оказался равным 1,5.

Отклонение от гиперболической зависимости скорости энзиматической реакции от концентрации субстрата наблюдалось и в том случае, если вместо пируватдегидрогеназного комплекса в опытах использовали его декарбоксилазный компонент (который и является собственно тиаминовым ферментом, непосредственно взаимодействующим с субстратом и катализирующим начальные этапы его окислительного декарбоксилирования). Правда, общая картина в данном случае получалась более сложная по сравнению с той, которая имела место при работе с пируватдегидрогеназным комплексом. Авторы [52] полагают, что усложнение картины во втором случае объясняется наличием в инкубационной смеси различных олигомерных форм пируватдекарбоксилазного компонента, характеризующихся различной ферментативной активностью [68].

Амид пировиноградной кислоты представляет собой близкий структурный аналог пирувата, но не может его замещать в качестве субстрата пируватдегидрогеназного комплекса. Ферментативная активность комплекса снижается при высоких концентрациях аналога и повышается при низких его концентрациях. Активирующий эффект проявляется в том, что кривая зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации пирувата приобретает гиперболическую форму (в противоположность сигмоидальной — в отсутствие аналога [52]). По мнению авторов, взаимодействие амида пировиноградной кислоты с пируватдегидрогеназным комплексом происходит в его субстрат-связывающих участках.

Приведенные экспериментальные данные указывают на то, что как и в случае пируватдекарбоксилазы, о чем говорилось в начале настоящей главы, пировиноградная кислота, помимо своей основной функции (субстратной), выполняет и регуляторную функцию, являясь аллостерическим активатором пируватдегидрогеназного комплекса.

### *Фосфорилирование — дефосфорилирование пируватдегидрогеназного комплекса*

На рис. 43 представлены результаты опытов по определению влияния АТФ на активность пируватдегидрогеназного комплекса, выделенного из почек быка. Отчетливо видно резкое снижение ферментативной активности комплекса уже при концентрации АТФ, равной  $1 \cdot 10^{-6}$  М (кривая 2). С увеличением концентрации скорость инактивации повышается, и при наличии в среде  $1 \cdot 10^{-4}$  М АТФ (кривая 5) фермент почти полностью инактивируется менее чем за 2 мин. Активность заингибированного пируватдегидрогеназного комплекса не восстанавливается ни при разведении, ни после диализа, ни после гель-фильтрации. Из всех других исследованных нуклеотидов лишь ИТФ вызывал слабое ингибирование. АМФ, АДФ, ЦТФ и УТФ (взяты в концентрации  $1 \cdot 10^{-3}$  М) были неэффективны [329]. Аналогичные результаты получены и для пируватдегидрогеназного комплекса из сердечной мышцы свиньи [547].

Ингибирование под действием АТФ сопровождается фосфорилированием пируватдегидрогеназного комплекса (рис. 44). При максимальной степени фосфорилирования (кривая 1) наблюдается полная потеря ферментативной активности (кривая 2). При использовании АТФ, меченного по фосфору, количество радиоактивности, включенной в белок, было примерно в два раза больше в опытах с  $\gamma$ - $P^{32}$  — АТФ, по сравнению с опытами, где добавляли  $\beta$ ,  $\gamma$ - $P^{32}$  — АТФ (оба препарата АТФ имели одинаковую удельную радиоактивность). Включения радиоактивности в белок из  $\alpha$ - $P^{32}$  — АТФ не происходило [329]. Отсюда следовало, что на пируватдегидрогеназный комплекс переносится конечный фосфатный остаток АТФ.

Фосфорилированные и потерявшие ферментативную активность препараты пируватдегидрогеназного комплекса могут быть реактивированы добавлением ионов маг-

Рис. 43. Влияние АТФ на активность пируватдегидрогеназного комплекса, выделенного из почек быка [329]

По оси ординат — величина ферментативной активности в % от исходной. Концентрация АТФ (М): 1 — 0,0; 2 —  $1 \cdot 10^{-8}$  М; 3 —  $5 \cdot 10^{-6}$  М; 4 —  $1 \cdot 10^{-5}$ ; 5 —  $1 \cdot 10^{-4}$ ; 6 —  $1 \cdot 10^{-3}$  М

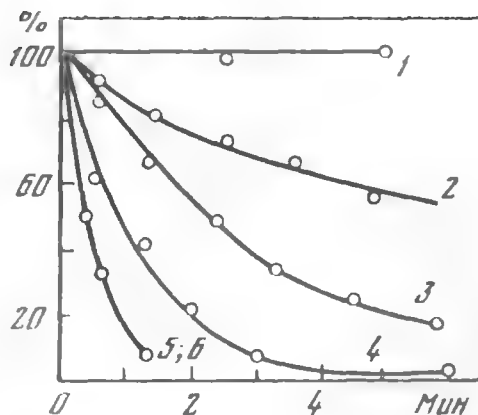
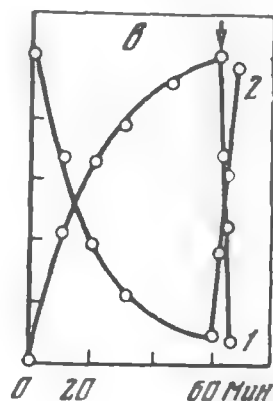
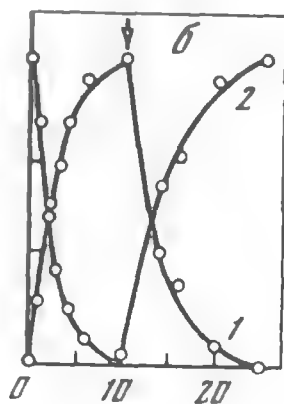
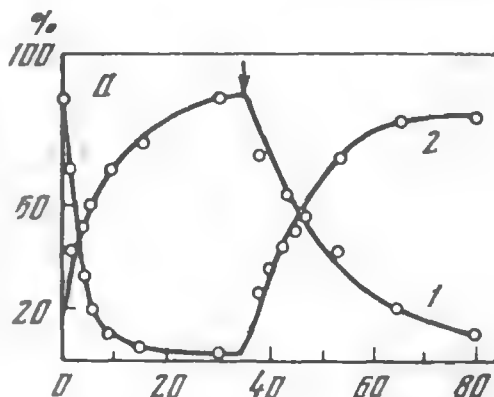


Рис. 44. Фосфорилирование и дефосфорилирование пируватдегидрогеназного комплекса, выделенного из почек (а) и сердечной мышцы (в) быка и печени свиньи (б) [328, 329]

По оси ординат — ферментативная активность и включение метки из  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -АТФ в белок (в % от максимальных значений); 1 — включение метки в белок; 2 — ферментативная активность. Стрелками указан момент добавления хлористого магния



ния (оптимальная концентрация  $1 \cdot 10^{-2}$  М). Восстановление ферментативной активности сопровождается потерей белком радиоактивности (см. рис. 44) и выделением в среду неорганического ортофосфата [329].

Добавление магния оказывалось эффективным не во всех случаях. Были препараты, для реактивации которых требовалось наряду с магнием добавить еще термолабильную белковую фракцию, полученную в качестве

побочного продукта на последних стадиях очистки пируватдегидрогеназного комплекса [329].

Приведенные выше данные указывали на то, что фосфорилирование и дефосфорилирование (и соответствующие им инактивация и реактивация) пируватдегидрогеназного комплекса осуществляются двумя различными ферментами — АТФ-специфичной киназой и фосфатазой, для действия которой необходим магний, и что эти ферменты входят в состав пируватдегидрогеназных комплексов.

Как следует из данных, приведенных на рис. 44, инактивация пируватдегидрогеназного комплекса из сердца быка аденозинтрифосфатом происходит значительно медленнее, чем соответствующих ферментных комплексов, выделенных из печени свиньи и почек быка. В то же время реактивация (и дефосфорилирование) в первом случае, наоборот, осуществляется быстрее. Объясняется это тем, что содержание (или удельная активность) фосфокиназы и фосфатазы в пируватдегидрогеназных комплексах, выделенных из разных источников, неодинаково. Отсутствие фосфатазы в некоторых препаратах пируватдегидрогеназного комплекса при наличии в них фосфокиназы свидетельствует в пользу того, что фосфатаза менее прочно связана с комплексом и частично (или полностью) отщепляется в процессе его выделения и очистки.

Чтобы выяснить, какой из ферментов пируватдегидрогеназного комплекса фосфорилируется и инактивируется под действием фосфокиназы, комплекс фосфорилировали аденозинтрифосфатом, меченным по конечному фосфатному остатку, и разделяли на составляющие его компоненты. Оказалось, что ни липонилтрансацилаза, ни липонилдегидрогеназа не содержали радиоактивности. Вся она была сосредоточена в пируватдекарбоксилазе. Молекулярный вес и коэффициент седиментации фосфорилированной и нефосфорилированной пируватдекарбоксилазы были одинаковыми [327, 329], и на моль белка приходилось два эквивалента связанного фосфора [329].

Последующее добавление магния и препарата фосфатазы сопровождалось отщеплением связанного фосфора и восстановлением ферментативной активности. Таким образом, было однозначно показано, что обратимому фосфорилированию и обусловленной им инактивации



подвергается пируватдекарбоксилазный компонент пируватдегидрогеназного комплекса.

Ферменты, катализирующие фосфорилирование и дефосфорилирование, были названы соответственно киназой пируватдегидрогеназы и фосфатазой пируватдегидрогеназы [329]. Как уже указывалось выше, пируватдекарбоксилаза, входящая в состав пируватдегидрогеназного комплекса грудной мышцы голубя и почек быка, состоит из четырех субъединиц, две из которых ( $\alpha$ -субъединицы) имеют молекулярный вес примерно по 42 000, две другие ( $\beta$ -субъединицы) — по 37 000. При добавлении  $\gamma$ -P<sup>32</sup> — АТФ (при наличии в среде пируватдегидрогеназы-киназы) происходит фосфорилирование пируватдекарбоксилазы. Последующий электрофорез в полиакриламидном геле дал возможность идентифицировать белковую фракцию, содержащую связанный с белком радиоактивный фосфор. Оказалось, что электрофоретическая подвижность радиоактивной фракции соответствует полипептидной цепи с мол. весом 42 000, тогда как фракция с мол. весом 37 000 была неактивна [84]. Таким образом, под действием киназы фосфорилируются только  $\alpha$ -субъединицы пируватдекарбоксилазы. Это соответствует наблюдению, что при фосфорилировании пируватдекарбоксилазы с ферментом связываются два фосфатных остатка на молекулу белка [329].

В первых опытах, в которых исследовали фосфорилирование пируватдекарбоксилазы, было показано, что для инактивации (и фосфорилирования) фермента из почек быка аденозинтрифосфатом добавления киназы не требовалось [329]. Создавалось впечатление, что киназа связана с пируватдекарбоксилазой и вместе с ней выделяется из пируватдегидрогеназного комплекса. Однако нельзя было исключить, что эти два фермента имеют очень близкие физико-химические свойства и не полностью разделяются теми методами, которые использовали для выделения и очистки пируватдекарбоксилазы.

Для выяснения этого вопроса из сердца быка и печени свиньи были выделены высокоочищенные пируватдегидрогеназные комплексы, которые характеризовались очень низкой киназной активностью. В то же время пируватдегидрогеназный комплекс почек быка, характеризующийся высокой киназой активностью, был разобран на составляющие его компоненты, и получили две отдельные

Таблица 16

*Инактивация пируватдегидрогеназных комплексов, выделенных из печени свиньи и сердечной мышцы быка, под действием киназы пируватдегидрогеназы, выделенной из почек быка [329]*

Во все пробы добавляли АТФ

| Источник получения пируватдегидрогеназного комплекса | Добавлено                     | Снижение ферментативной активности, % от исходной (до добавления АТФ) |
|------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Почки быка                                           | Без добавок                   | 79                                                                    |
| Печень свиньи                                        | Без добавок                   | 8                                                                     |
| То же                                                | Липоилтрансациетилаза *       | 82                                                                    |
| Сердечная мышца быка                                 | Без добавок                   | 14                                                                    |
| То же                                                | Пируватдекарбоксилаза *       | 17                                                                    |
| »                                                    | Липоилтрансациетилаза *       | 87                                                                    |
| »                                                    | Киназа пируватдегидрогеназы * | 71                                                                    |

\* Выделена из почек быка.

фракции, содержавшие соответственно пируватдекарбоксилазу и липоилтрансациетилазу. Использование сефарозы в процессе выделения и очистки липоилтрансациетилазы исключало возможность загрязнения данного фермента (мол. вес около 3 000 000 [84]) низкомолекулярными белками, каким могла быть пируватдегидрогеназкиназа.

Как следует из данных, приведенных в табл. 16, пируватдегидрогеназный комплекс из печени и мышцы сердца лишь в незначительной степени инактивируется при добавлении АТФ. Степень инактивации во много раз увеличивается при добавлении в систему наряду с АТФ препарата липоилтрансациетилазы, выделенной из пируватдегидрогеназного комплекса почек, и становится сопоставимой со степенью инактивации нативного пируватдегидрогеназного комплекса почечной ткани. В то же время добавление в систему пируватдекарбоксилазного компонента пируватдегидрогеназного комплекса почек практически не даст никакого эффекта.

Из приведенных данных следует, что пируватдегидрогеназкиназа связана не с пируватдекарбоксилазным,

а с липоилтрансацилазным компонентом пируватдегидрогеназного комплекса. Другой вывод, который можно сделать, заключается в том, что фосфокиназа почек быка активна не только с собственным пируватдегидрогеназным комплексом, но и с комплексами, выделенными из печени свиньи и сердца быка. Оба этих вывода подтвердились в последующих экспериментах, когда пируватдегидрогеназа-киназа была отделена от липоилтрансацилазы пируватдегидрогеназного комплекса почек и при добавлении к пируватдегидрогеназному комплексу сердечной мышцы вызывала в присутствии АТФ отчетливо выраженное его ингибирование (см. табл. 16).

Взаимозаменяемость показана и для активирующего фермента — фосфатазы пируватдегидрогеназы. С этой целью использовали пируватдегидрогеназные комплексы, предварительно инактивированные преинкубацией с АТФ. Из данных табл. 17 видно, что восстановление активности пируватдегидрогеназного комплекса из почек быка идет в одинаковой степени вне зависимости от того, из какого источника выделена фосфатаза — печени свиньи или сердечной мышцы и почек быка. В свою очередь фосфатаза почек активировала пируватдегидрогеназный комплекс печени [328]. Аналогичные данные были получены и для других тканей. Так, фосфорилированный пируватдегидрогеназный комплекс из мозга свиньи реактивировался фосфатазными препаратами, выделенными из сердца свиньи и печени крыс, а пируватдегидрогеназный комплекс из сердечной мышцы свиньи — фосфатазой из мозга [475].

Таблица 17

*Функциональная идентичность фосфатаз пируватдегидрогеназы, выделенных из почек, печени и сердечной мышцы [329]*

| Источник инактивированного пируватдегидрогеназного комплекса | Источник добавленной фосфатазы | Степень восстановления активности, % от максимальной |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------|
| Почки                                                        | Без добавок                    | 13                                                   |
| То же                                                        | Почки                          | 87                                                   |
| »                                                            | Печень                         | 80                                                   |
| »                                                            | Сердечная мышца                | 96                                                   |
| Печень                                                       | Без добавок                    | 0                                                    |
| То же                                                        | Почки                          | 78                                                   |

## *Факторы, влияющие на фосфорилирование пируватдегидрогеназного комплекса*

*Влияние тиаминпирофосфата.* Скорость инактивации пируватдегидрогеназного комплекса под действием пируватдегидрогеназы-киназы уменьшается при добавлении тиаминпирофосфата [419].

Фосфорилирование казенна, которое также способна осуществлять пируватдегидрогеназа-киназа, не изменяется в присутствии тиаминпирофосфата [259]. На основании этих данных авторы приходят к заключению, что снижение скорости инактивации пируватдегидрогеназного комплекса обусловлено взаимодействием тиаминпирофосфата с пируватдекарбоксилазным компонентом комплекса, а не с киназой.

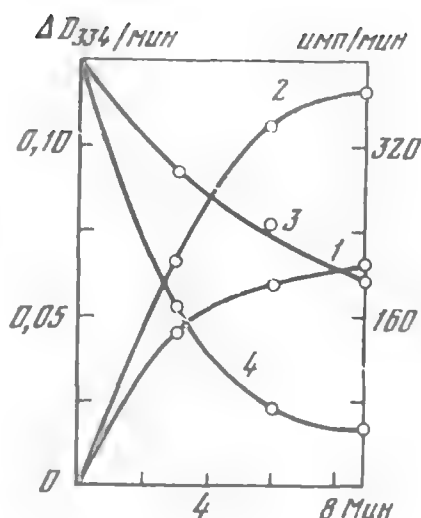
С другой стороны, в результате фосфорилирования пируватдекарбоксилазного компонента его способность связывать тиаминпирофосфат существенно снижается [419]. Таким образом, участки связывания кофермента и фосфорилирования в молекуле пируватдекарбоксилазы влияют друг на друга.

*Действие субстрата.* Как следует из данных рис. 45, пируват снижает скорость инактивации (и фосфорилирования) пируватдегидрогеназного комплекса аденозинтрифосфатом. Это было показано с ферментными препаратами, полученными из разных источников: мозга [475] и сердца [328] свиньи, почек и сердца быка [259, 328], жировой ткани [144], молочной железы крысы [127]. Эффективность пирувата неодинакова. Так,  $5 \cdot 10^{-4}$  М пируват практически полностью предохраняет от инактивации пируватдегидрогеназный комплекс, выделенный из сердца быка. В тех же условиях активность пируватдегидрогеназного комплекса из печени свиньи и почек быка сохраняется соответственно лишь на 60 и 20%. Действие пирувата специфично:  $\alpha$ -кетонизовалериановая,  $\alpha$ -кетоглутаровая и щавелевоуксусная кислоты, не являющиеся субстратами пируватдегидрогеназного комплекса, не влияют на степень его инактивации. В то же время  $\alpha$ -кетобутират, который так же, как и пируват, подвергается окислительному декарбоксилированию, оказывает защитный эффект, хотя и менее выраженный [328].

Исследование влияния пирувата на скорость фосфорилирования пируватдегидрогеназных комплексов позво-

Рис. 45. Влияние пирувата на инактивацию и фосфорилирование пируватдегидрогеназного комплекса из мозга свиньи [475]

1, 2 — радиоактивность белка; 3, 4 — ферментативная активность; 2, 4 — пируват не добавлялся; 1, 3 — добавлен пируват. По оси ординат — соответственно, ферментативная активность и включение метки из  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -АТФ в белок



лило установить, что значения кажущихся констант ингибирования варьируют от препарата к препарату и составляют величины порядка  $0,9\text{--}2,0 \cdot 10^{-3}$  М для пируватдегидрогеназного комплекса почек быка и  $0,8\text{--}3,0 \cdot 10^{-4}$  М — для препаратов, полученных из сердца быка. В то же время известно, что пируватдекарбоксилазные компоненты двух указанных комплексов очень близки по свойствам: они имеют одинаковые молекулярные веса, субъединичную структуру и пептидные карты триптических гидролизатов [84, 327]. Практически одинаковы и величины их кажущихся констант Михаэлиса для пирувата при использовании его в качестве субстрата в пируватдегидрогеназной реакции. Они равны соответственно  $4,4 \cdot 10^{-5}$  М и  $3,5 \cdot 10^{-5}$  М [259].

Здесь нужно отметить два момента. Во-первых, величины константы ингибирования для пирувата значительно выше соответствующих значений константы Михаэлиса. Во-вторых, ингибиторные константы для пирувата, полученные с двумя вышеуказанными ферментными комплексами, различаются между собой примерно на порядок, в то время как величины  $K_m$ , полученные с теми же комплексами, по существу имеют одно и то же значение. Поэтому следует предположить, что в пируватдегидрогенажном комплексе имеется два типа участков связывания пирувата. К первому типу относится активный центр пируватдекарбоксилазного компонента, в котором происходит связывание молекул пирувата, подвергающихся ферментативному превращению. Второй — это «ингиби-

торный участок», где связываются молекулы пирувата, снижающие скорость фосфорилирования комплекса.

Мы уже указывали выше, что константа ингибирования для пирувата с пируватдегидрогеназным комплексом из почек быка равна  $0,9-2,0 \cdot 10^{-3}$  М, а с пируватдегидрогеназным комплексом из мышцы сердца —  $0,8-3,0 \cdot 10^{-4}$  М. Оказалось, что если к пируватдегидрогеназному комплексу из сердечной мышцы добавить (в присутствии АТФ) фосфокиназу почек, то комплекс ведет себя аналогично комплексу из почек, т. е. скорость его инактивации снижается в присутствии пирувата с величиной константы ингибирования для последнего равной примерно  $1,1 \cdot 10^{-3}$  М [259].

Эти данные указывают на то, что в противоположность коферменту, который тоже предохраняет пируватдегидрогеназный комплекс от инактивации аденозинтрифосфатом, действие пирувата направлено не на пируватдекарбоксилазу, а на фосфокиназу. Подтверждением этому служат и опыты с казеином, сущность которых заключается в следующем: казеин, так же как и пируватдекарбоксилаза, способен фосфорилироваться киназой пируватдегидрогеназы, хотя со значительно меньшей скоростью. Пируват и  $\alpha$ -кетобутират (субстраты пируватдегидрогеназного комплекса) предотвращали фосфорилирование казеина, в то время как  $\alpha$ -кетоглутарат влияния на этот процесс не оказывал [259].

Сильное ингибирование киназы пируватдегидрогеназы относительно низкими концентрациями пирувата может указывать на возможность ее регуляции пируватом в физиологических условиях.

*Влияние АДФ.* Степень инактивации пируватдегидрогеназного комплекса из мозга [475] и печени [328] свиньи, из почек и сердца быка [328] аденозинтрифосфатом снижается при добавлении в систему АДФ. Малат, щавелевоуксусная, янтарная, лимонная, изолимонная, молочная, фосфоэнолпирувиноградная, глутаминовая, аспарагиновая кислоты, а также АМФ, ГДФ, аланин, карнитин, ацетил-КоА и ацетоацетил-КоА влияния не оказывали. Действие АДФ конкурентно по отношению к АТФ и обусловлено снижением степени фосфорилирования пируватдегидрогеназного комплекса. Величины константы ингибирования для АДФ с ферментными комплексами, выделенными из ткани почек и сердца быка,

варьируют в пределах  $1 \cdot 10^{-4}$ — $3 \cdot 10^{-4}$  М [259]. Конкурентный по отношению к АТФ характер ингибирования указывает на то, что действие АДФ направлено, очевидно, на киназу. Значительное различие в сродстве АТФ и АДФ к киназе (кажущаяся  $K_i$  для АДФ составляет величину порядка  $2 \cdot 10^{-4}$  М, а кажущаяся  $K_m$  для АТФ — около  $2 \cdot 10^{-5}$  М [259]) означает, что регуляция активности данного фермента путем изменения соотношения АТФ и АДФ в митохондриях вряд ли может иметь существенное значение в условиях клетки.

*Участие липоилтрансацилазы  
в процессах фосфорилирования  
и дефосфорилирования*

Уже в первых работах, в которых исследовали инактивацию пируватдекарбоксилазы аденозинтрифосфатом, было показано, что скорость процесса повышается при добавлении в систему липоилтрансацилазы [328, 329]. Тогда это интерпретировали таким образом, что липоилтрансацилаза, связывая пируватдекарбоксилазу, меняет ее конформацию, которая становится более благоприятной для фосфорилирования. Последующие работы, проведенные с высокоочищенными препаратами липоилтрансацилазы, не содержащими фосфокиназу, не подтвердили первоначально высказанные соображения, однако позволили выяснить истинную природу активации процесса фосфорилирования липоилтрансацилазой.

Оказалось, что увеличение скорости фосфорилирования пируватдекарбоксилазы при добавлении липоилтрансацилазы объясняется повышением сродства пируватдекарбоксилазы к фосфокиназе: величина кажущейся константы Михаэлиса фосфокиназы для субстрата (пируватдекарбоксилазы) уменьшается более чем в 30 раз. Максимальная скорость реакции фосфорилирования при этом примерно удваивалась [259].

Липоилтрансацилаза характеризуется способностью увеличивать не только скорость фосфорилирования пируватдекарбоксилазы, но и скорость ее дефосфорилирования. Во втором случае активирующее влияние липоилтрансацилазы исчезало при добавлении ЭГТА и опять проявлялось при последующем добавлении кальция [383]. Снижение фосфатазной активности в присутствии ком-

Таблица 18

Влияние липоилтрансацилазы (ЛТА), кальция и магния на активность фосфатазы пируватдегидрогеназы [383]

Инкубационная смесь содержала  $1 \cdot 10^{-2}$  М магний.

В качестве субстрата фосфатазы добавлена фосфорилированная ( $^{32}\text{P}$ )-пируватдекарбоксилаза, изолированная из пируватдегидрогеназного комплекса

| Инкубационная смесь                         | Фосфатазная активность, нмоль $^{32}\text{P}_\text{H}$ ,<br>отщепившегося за 1 мин/мг фосфатазы |                 |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
|                                             | почки                                                                                           | сердечная мышца |
| Фосфатаза                                   | 2,6                                                                                             | 2,1             |
| То же + $\text{Ca}^{2+}$                    | 2,7                                                                                             | 3,2             |
| » + ЭГТА                                    | 2,8                                                                                             | 3,3             |
| » + ЭГТА + $\text{Ca}^{2+}$                 | 3,3                                                                                             | 4,3             |
| Липоилтрансацилаза                          | 0,0                                                                                             | 0,0             |
| Фосфатаза + ЛТА                             | 22,8                                                                                            | 20,5            |
| То же + ЛТА + $\text{Ca}^{2+}$              | 34,2                                                                                            | 17,5            |
| » + ЛТА + $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ | 0,0                                                                                             | 0,0             |
| » + ЛТА + ЭГТА                              | 5,8                                                                                             | 5,6             |
| » + ЛТА + ЭГТА + $\text{Ca}^{2+}$           | 32,1                                                                                            | 27,7            |

плексона и ее увеличение при добавлении кальция наблюдали и при работе с пируватдегидрогеназными комплексами [259, 474].

Существенно отметить, что влияние ЭГТА (при работе с пируватдекарбоксилазой) наблюдалось только в присутствии липоилтрансацилазы. Без нее отщепление фосфора от фосфорилированной пируватдекарбоксилазы под действием фосфатазы происходило с одинаковой скоростью вне зависимости от того, имелся в системе ЭГТА или нет (табл. 18). В присутствии кальция, но без добавления магния дефосфорилирования не наблюдалось, т. е. кальций не мог замещать магний в качестве компонента фосфатазной реакции, а значит он не участвует непосредственно в дефосфорилировании. Не имеет он отношения и к связыванию пируватдекарбоксилазы с трансацилазой, так как скорость реконструкции пируватдегидрогеназного комплекса из пируватдекарбоксилазы, липоилтрансацилазы и липоилдегидрогеназы не снижалась в присутствии ЭГТА. Оставалось предположить,



что ион кальция участвует в связывании фосфатазы трансацетилазой. Для проверки такого предположения были поставлены следующие эксперименты [383].

Два указанных фермента преинкубировали с ЭГТА, кальцием, магнием и пируватдекарбоксилазой, взятыми в разных сочетаниях. Затем с помощью ультрацентрифугирования отделяли свободную фосфатазу от комплекса фосфатазы с трансацетилазой. В осадке, содержащем комплекс двух ферментов, определяли величину фосфатазной активности. Из данных, представленных ниже, видно, что количество фосфатазы, связанной с липоилтрансацетилазой, не изменяется при добавлении магния или пируватдекарбоксилазы, увеличивается в присутствии кальция и уменьшается в присутствии ЭГТА. Действие комплекса снималось кальцием.

| Инкубационная смесь                                                               | Активность связанной<br>фосфатазы, нмоль $^{32}\text{P}_i$ ,<br>высвободившегося<br>за 1 мин |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Липоилтрансацетилаза (ЛТА)                                                        | 0,0                                                                                          |
| Фосфатаза + ЛТА                                                                   | 0,059                                                                                        |
| То же + ЛТА + $\text{Ca}^{2+}$                                                    | 0,171                                                                                        |
| » + ЛТА + ЭГТА                                                                    | 0,018                                                                                        |
| » + ЛТА + ЭГТА + $\text{Ca}^{2+}$                                                 | 0,165                                                                                        |
| » + ЛТА + ЭГТА + $\text{Mg}^{2+}$                                                 | 0,016                                                                                        |
| » + ЛТА + ЭГТА + $\text{Mg}^{2+}$ + $\text{Ca}^{2+}$                              | 0,174                                                                                        |
| » + ЛТА + ЭГТА + $\text{Mg}^{2+}$ + $\text{Ca}^{2+}$ + пиру-<br>ватдекарбоксилаза | 0,171                                                                                        |

Дальнейшие исследования показали, что повышение фосфатазной активности под действием липоилтрансацетилазы при наличии в среде ионов кальция обусловлено повышением сродства фосфорилированной пируватдекарбоксилазы к фосфатазе. При наличии в среде липоилтрансацетилазы, но без кальция, кажущаяся величина  $K_m$  пируватдегидрогеназы-фосфатазы почек быка для субстрата (фосфорилированная пируватдекарбоксилаза) равнялась  $5,8 \cdot 10^{-5}$  М. В тех же условиях, но с кальцием, значение  $K_m$  уменьшалось в 20 раз. Максимальная скорость реакции дефосфорилирования оставалась при этом неизменной. Таким образом, кальций, способствуя переходу свободной формы фосфатазы в связанную, тем самым повышает ее сродство к фосфорилированной пируватдекарбоксилазе [383].

Как уже указывалось выше (см. табл. 18), активность фосфатазы пируватдегидрогеназы повышается примерно в 10 раз при связывании ее с липоилтрансацетилазой. Связь эта непрочная и легко разрушается в процессе выделения и очистки пируватдегидрогеназного комплекса [327, 328, 329, 474, 549]. Стабильность связи повышается при наличии в среде кальция. Отсюда следует, что контролируемый кальцием процесс ассоциации-диссоциации комплекса фосфатаза — липоилтрансацетилаза может являться одним из регуляторных механизмов клетки, обеспечивающим соответствующий уровень ферментативной активности пируватдегидрогеназного комплекса путем его фосфорилирования — дефосфорилирования за счет АТФ.

Интересно заметить, что активность другого регуляторного фермента киназы пируватдегидрогеназы, также повышается при взаимодействии с трансацетилазой, но лишь в два раза [259]. В противоположность фосфатазе киназа прочно связана с липоилтрансацетилазой [327], и в образовании этого комплекса кальций, по-видимому, не участвует [383].

*Некоторые свойства регуляторных ферментов,  
входящих в состав пируватдегидрогеназных  
комплексов*

В данном разделе речь пойдет в основном о регуляторных ферментах — киназе пируватдегидрогеназы и фосфатазе пируватдегидрогеназы, выделенных из трех источников: почек быка, сердца быка и свиньи. Эти ферменты выделены в высокоочищенном состоянии и изучены наиболее полно [259, 474].

*Киназа пируватдегидрогеназы.* Фермент прочно связан с липоилтрансацетилазой и выделяется вместе с нею при разобщении пируватдегидрогеназного комплекса на составляющие его компоненты. Разделение может быть достигнуто обработкой *n*-меркурибензоатом или *n*-меркурибензолсульфонатом с последующим ультрацентрифугированием [327, 328]. Полученный таким образом фермент из почек однороден и имеет коэффициент седиментации 5,5 S. Препарат киназы, выделенный из пируватдегидрогеназного комплекса сердечной мышцы быка,

был неоднороден и его коэффициент седиментации не определялся.

Киназы из почек и сердца быка максимально активны при рН 7,0—7,2. Истинным субстратом киназы является, по-видимому, не свободный АТФ, а его комплекс с магнием [259]. Марганец может замещать магний в качестве кофактора энзима, показывая при этом ту же величину  $K_m$ . Кальций неактивен, но и не является ингибитором данного фермента.

*Фосфатаза пируватдегидрогеназы.* Из сердечной мышцы свиньи [474] и быка [327] фермент очищен практически до гомогенного состояния. Ферментные препараты из почек быка содержали, согласно данным электрофореза, примеси других белков [327]. Мол. вес всех трех ферментов был одинаков и равнялся примерно 100 000. Электрофорез в полиакриламидном геле, проведенный в присутствии додецилсульфата натрия, показывает наличие одной основной белковой полосы, электрофоретическая подвижность которой соответствовала мол. весу около 100 000. Другими словами, фермент не содержит субъединиц и его молекула представлена одной полипептидной цепью.

Фосфатазная активность не проявляется в отсутствие двухвалентных катионов. Максимальная степень активации достигается при концентрации магния около  $1 \cdot 10^{-2}$  М, марганца — порядка  $0,5 \cdot 10^{-2}$  М. Кобальт был наполовину менее эффективен, чем магний или марганец, а цинк вообще не активен. Кальций при относительно низких концентрациях в небольшой степени восстанавливал фосфатазную активность. При высокой концентрации кальция в среде наблюдалось ингибирование фермента, предварительно активированного магнием.

В присутствии магния оптимум рН фосфатазы из сердца свиньи и быка равен 7,1, а из почек быка — 6,7. При замене магния на марганец оптимум рН для двух последних ферментов сдвигается в щелочную сторону и становится равным 7,5—7,6.

Фосфатаза характеризуется высокой степенью специфичности. Так, например, фермент, выделенный из сердечной мышцы свиньи, отщепляет фосфор от фосфорилированной пируватдекарбоксилазы и не действует на *п*-нитрофенилфосфат, неорганический пирофосфат, ацетилфосфат, глицерол-1-фосфат, фосфотреонин, фосфо-

рилетаноламин, глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, ИАД, АМФ, АДФ, АТФ и фосфитин. Не действовал он и на фосфорилазу даже при использовании больших концентраций фосфатазы и продолжительном времени инкубации. Таким образом, судя по специфичности, фосфатаза пируватдегидрогеназы отличается от других хорошо охарактеризованных протенинфосфатаз [257, 337, 349, 403, 497]. Что касается истинного субстрата фосфатазы, пируватдегидрогеназы, то, как уже говорилось выше, фермент, полученный из одной какой-либо ткани, гидролизует фосфорилированные производные пируватдекарбоксилазного компонента пируватдегидрогеназных комплексов, выделенных и из других источников.

При работе с малоочищенными препаратами фосфатазы, выделенными из сердечной мышцы свиньи, был обнаружен интересный факт. Он заключался в том, что реактивация (т. е. дефосфорилирование) пируватдекарбоксилазы фосфатазой в значительной степени стимулировалась циклической АМФ [549]. Другие циклические нуклеотиды (циклические ЦМФ, ГМФ, ИМФ, УМФ), а также 5'-АМФ были неэффективны.

Для действия циклической АМФ требовалось присутствие в среде АТФ. Без него дефосфорилирование фосфопируватдекарбоксилазы осуществлялось с одинаковой скоростью вне зависимости от того, добавлялась циклическая АМФ или нет. Создавалось впечатление, что фосфатаза пируватдегидрогеназы активируется путем фосфорилирования аденозинтрифосфатом за счет действия специфической киназы, присутствующей в инкубационной среде, и в свою очередь активируемой циклической АМФ [549]. Тем более, что в литературе описан целый ряд киназ, осуществляющих в присутствии АТФ фосфорилирование различных белков и подверженных влиянию циклической АМФ [93, 129, 320, 323, 358, 535].

Для выяснения возможности фосфорилирования фосфатазы фермент преинкубировали с АТФ, меченным по конечному фосфатному остатку. Оказалось, что фосфорилирование фосфатазы происходит, но с очень малой скоростью, которая, однако, во много раз увеличивается при добавлении циклической АМФ [549]. Заметим, что ощутимый эффект наблюдается уже при концентрации аденозинциклофосфата, равной  $1 \cdot 10^{-7}$  М. С повышением

температуры от 0 до 37° скорость фосфорилирования увеличивалась и температурный коэффициент составлял величину порядка двух. Это указывает на то, что фосфорилирование является ферментативным процессом, а не происходит в результате простой адсорбции радиоактивного фосфора на белке.

Высокоочищенная фосфатаза, в противоположность грубым препаратам фермента, не активировалась циклической АМФ [474]. Не исключено, что при очистке фермента предполагаемая киназа фосфатазы уходит с балластными белками и что это явилось причиной отрицательных результатов. Не было, однако, выявлено влияния аденозинциклофосфата и при исследовании фосфатазы, выделенной из других источников (почки и сердце быка), даже при использовании неочищенных препаратов фермента [259]. Правда, в качестве исходного материала здесь использовали митохондрии, а не тканевой экстракт, как в первом случае.

Трудно на основании имеющихся в настоящее время литературных данных делать какие-либо определенные выводы. Тем не менее ясно, что вопрос этот важен с точки зрения механизма регуляции тиаминовых ферментов и требует дальнейшего изучения.

В заключение данного раздела отметим следующее. Как указывалось выше, активность киназы и фосфатазы существенно зависит от концентрации ионов магния в среде, причем если фосфокиназная активность еще проявляется в слабой степени в отсутствие катиона, то фосфатаза полностью неактивна. Сродство магния к киназе значительно выше, чем к фосфатазе. Это может иметь физиологическое значение в системе регуляции фосфатазы. Дело в том, что общее содержание магния, например, в митохондриях печени крыс, составляет 20—25 нмоль на 1 мг белка [95], и около половины всего количества приходится на матрикс. Судя по литературным данным [100, 450, 481], пируватдегидрогеназный комплекс с его регуляторными ферментами — киназой и фосфатазой — также локализован в митохондриальном матриксе. Концентрация свободного магния в матриксе может зависеть от соотношения АТФ/АДФ, так как, во-первых, содержание адениновых нуклеотидов в митохондриях равно 10—15 нмоль на 1 мг белка [147], т. е. примерно такое же, как и содержание магния в матриксе,

а во-вторых, сродство магния к АТФ значительно выше, чем к АДФ [113]. Таким образом, уменьшение отношения АТФ/АДФ должно сопровождаться увеличением концентрации свободного магния, что в свою очередь приводило бы к активации фосфатазы пируватдегидрогеназы.

### *Количественное содержание отдельных ферментов в пируватдегидрогеназных комплексах*

Мы уже говорили, что пируватдегидрогеназные комплексы состоят из трех ферментов, катализирующих ряд последовательных стадий окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты. Липоилтрансацилаза, кроме каталитической, выполняет еще и структурную функцию, осуществляя связывание двух других ферментов (эти два фермента друг с другом стабильного комплекса не образуют). Согласно данным электронной микроскопии [262], молекула липоилтрансацилазы должна состоять из 60 идентичных или очень близких по свойствам полипептидных цепей и включать в себя 60 эквивалентных участков связывания пируватдекарбоксилазы и столько же — для липоилдегидрогеназы. Для проверки такого заключения в лаборатории Рида был разработан метод получения высокоочищенных препаратов пируватдегидрогеназных комплексов из митохондрий почек и сердца быка и последующего их разделения на составляющие компоненты без потери ими своих нативных свойств [327—329]. Выделенные комплексы и индивидуальные ферменты были тщательно проанализированы, и при этом получены следующие результаты [84, 259, 327].

Препараты липоилтрансацилазы, изолированные из пируватдегидрогеназных комплексов почек и сердца быка, оказались очень близки по мол. весу ( $3\,120\,000 \pm \pm 200\,000$ ), аминокислотному составу и характеру пептидных карт триптических гидролизатов. Методом седиментационного равновесия в 6 М гуанидинхлориде показано, что каждый из указанных ферментов состоит из 60, по-видимому, идентичных полипептидных цепей (мол. вес 52 000), содержащих по одному остатку ковалентно связанной липоевой кислоты.

Пируватдекарбоксилазные компоненты пируватдегидрогеназных комплексов также очень близки по свойствам. Каждый представляет собой тетрамер, имеющий

структуру  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  и мол. вес порядка 154 000. В молекуле пируватдегидрогеназных комплексов содержится 30 молекул пируватдекарбоксилазного компонента, т. е. на 60 полипептидных цепей липонилтрансацилазы приходится 60 пируватдекарбоксилазных единиц типа  $\alpha\beta$ . Остается неясным, в какой форме пируватдекарбоксилаза находится в пируватдегидрогеназном комплексе — в тетрамерной ( $\alpha_2\beta_2$ ) или в виде димерных функциональных единиц ( $\alpha\beta$ ), которые лишь в процессе выделения и очистки фермента объединяются в тетрамер.

Неожиданно низким оказалось содержание в пируватдегидрогеназном комплексе третьего фермента — липонилдегидрогеназы. Этот фермент, имеющий мол. вес около 110 000, две молекулы связанного ФАД и состоящий из двух, по-видимому, идентичных полипептидных цепей, обнаружен в количестве 5—6 молей на моль комплекса. Даже если предположить, что каталитически активной является каждая субъединица, то и тогда его содержание в комплексе все еще оказывается низким по сравнению с двумя другими, функционально с ним связанными ферментами. Заметим, что такое же низкое содержание липонилдегидрогеназы было обнаружено и в пируватдегидрогеназном комплексе, выделенном из сердечной мышцы свиньи [206].

Можно предположить, что липонилдегидрогеназа частично отщепляется от пируватдегидрогеназного комплекса в процессе его выделения и очистки из митохондрий (такая возможность предполагается и находит экспериментальное подтверждение для пируватдекарбоксилазного компонента пируватдегидрогеназного комплекса мышцы сердца свиньи [206]). Действительно, на некоторых стадиях очистки обнаруживались ощутимые количества липонилдегидрогеназы, не связанной с комплексом [335, 425], однако ее добавление к пируватдегидрогеназному комплексу не сказывалось на скорости окислительного декарбоксилирования пирувата. Не исключено, однако, что конформация липонилдегидрогеназы, отщепившейся от пируватдегидрогеназного комплекса в процессе его выделения, изменяется таким образом, что фермент теряет способность связываться с комплексом и поэтому не может проявить свое каталитическое действие.

Предлагается и другое объяснение низкого содержания липонилдегидрогеназы в пируватдегидрогеназном ком-

плексе. Заключается оно в том, что одна молекула липонилдегидрогеназы, или ее мономерная форма, присоединенная к липонилтрансацилазе, способна взаимодействовать с несколькими остатками восстановленной липоевой кислоты [84].

Киназа пируватдегидрогеназы прочно связана с липонилтрансацилазным компонентом пируватдегидрогеназного комплекса [327—329]. На моль липонилтрансацилазы приходится около 5 молей киназы (объектом исследования в данном случае служила почечная ткань быка). Приведенные данные трудно объяснить с точки зрения специфичности связывания киназы с липонилтрансацилазой, так как молекула последней, как уже указывалось выше, состоит из 60 очень близких по свойствам полипептидных цепей. Остается поэтому предположить отсутствие специфичности во взаимодействии этих двух ферментов или, как и в случае липонилдегидрогеназы, возможность отщепления киназы при выделении пируватдегидрогеназного комплекса [420].

Связь фосфатазы пируватдегидрогеназы с пируватдегидрогеназным комплексом непрочная и легко разрушается при изолировании комплекса из ткани. На основании величины молекулярного веса высокоочищенных препаратов фермента и их удельной активности, а также активности, определяемой в экстрактах митохондрий, было рассчитано количественное содержание фосфатазы. Оказалось, что в экстрактах митохондрий почек и сердца быка на моль пируватдегидрогеназного комплекса приходится около 5 молей фосфатазы [327], т. е. столько же, сколько и другого регуляторного фермента — киназы пируватдегидрогеназы. Это примерно в десять раз меньше, чем содержание в пируватдегидрогеназном комплексе пируватдекарбоксилазы — субстрата двух указанных выше ферментов. Не исключается, однако, что в экстрактах митохондрий часть киназы пируватдегидрогеназы и фосфатазы пируватдегидрогеназы находится в неактивной форме [84].



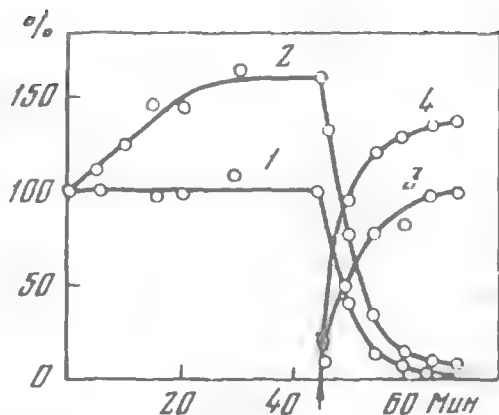
*Биологическая роль фосфорилирования  
и дефосфорилирования  
пируватдегидрогеназных комплексов*

Высокоочищенные ферментные препараты пируватдегидрогеназных комплексов, получаемые в разных лабораториях, часто имели неодинаковую удельную активность даже при использовании одного и того же источника выделения. В ряде случаев различия были весьма существенные. Это дало возможность предположить, что пируватдегидрогеназные комплексы выделяются в частично фосфорилированной (неактивной) форме. Предположение получило экспериментальное подтверждение, которое заключалось в следующем.

Если препарат пируватдегидрогеназного комплекса, выделенный из сердечной мышцы свиньи и содержащий киназу, но не содержащий фосфатазу, инкубировать с фосфатазой в присутствии магния, то измеряемая величина его ферментативной активности увеличивается примерно в полтора раза (рис. 46, кривая 2) (в других опытах степень активации была выражена в еще большей степени). За то же время в контроле (с магнием, но без фосфатазы) никаких изменений не наблюдалось (кривая 1). Последующее добавление АТФ, меченного по конечному фосфатному остатку, и ЭДТА (для связывания избытка ионов магния, требовавшихся для действия фосфатазы) (на рис. 46 показано стрелкой) приводит к полной инактивации ферментного препарата в обеих пробах (кривые 1 и 2). Включение меченого фосфора в контрольные препараты (кривая 3) происходило в значительно меньшей степени по сравнению с препаратами, которые предварительно обрабатывали фосфатазой (кривая 4). Объясняется это тем, что контрольные препараты уже изначально содержали часть пируватдегидрогеназного комплекса в фосфорилированной форме.

Аналогичные результаты были получены и при работе с гомогенатами мозга крыс [475]. Пируватдегидрогеназная активность в них равнялась 38,9 МЕ на 1 г сырого веса ткани, а после преинкубации с  $1 \cdot 10^{-2}$  М магнием (концентрация катиона, достаточная для максимальной активации присутствовавшей в гомогенатах фосфатазы пируватдегидрогеназы) активность увеличивалась до 56,6 МЕ. Более того, частично очищенные препараты пи-

Рис. 46. Фосфорилирование и изменение ферментативной активности пируватдегидрогеназного комплекса, выделенного из сердечной мышцы свиньи [549]



1, 3 — контроль; 2, 4 — добавлена пируватдегидрогеназа-фосфатаза; 1, 2 — ферментативная активность, 3, 4 — включение меченого фосфора в пируватдегидрогеназный комплекс. Стрелкой показано время добавления АТФ, меченого по конечному фосфатному остатку.

За 100% принята исходная активность ферментного препарата и исходная степень его фосфорилирования

руватдегидрогеназного комплекса из грудной мышцы голубя активировались при добавлении магния в 5—8 раз [271].

Пируватдегидрогеназная активность (без добавления магния) в гомогенатах почек и сердечной мышцы крыс проявлялась только на 70%, т. е. 30% пируватдегидрогеназного комплекса находилось в неактивной (фосфорилированной) форме. Голодание в течение суток снижало величину определяемой активности в семь раз [550]. Другими словами — около 90% всего пируватдегидрогеназного комплекса переходило в неактивную форму. Одновременно с этим отмечалось повышение количества свободных жирных кислот в плазме. При тех же условиях и даже при более продолжительном голодании (до 96 ч) уровень пируватдегидрогеназной активности в гомогенатах мозга крыс оставался неизменным [475].

Известно, что энергетические потребности мозговой ткани обеспечиваются за счет расщепления глюкозы, извлекаемой из кровяного русла. Окисление жирных кислот в мозгу происходит с очень низкой скоростью. При дефиците углеводов в организме высших животных обменные процессы в нем перестраиваются таким образом, чтобы снабжение центральной нервной системы глюкозой оставалось бы практически неизменным. Другими словами, основное количество оставшейся или новообра-

зующейся из других источников глюкозы расходуется на нужды нервной ткани.

В противоположность мозговой ткани процесс окисления жирных кислот в почках и сердце идет интенсивно. Возможно в связи с этим, что процессы фосфорилирования-дефосфорилирования пируватдегидрогеназного комплекса (т. е. его инактивация и активация) каким-то образом связаны с интенсивностью обмена жирных кислот. В сердце, например, где новообразования глюкозы не происходит (эта ткань потребляет глюкозу из кровяного русла), ингибирование пируватдегидрогеназного комплекса аденозинтрифосфатом предохраняло бы (или снижало интенсивность) расщепление пирувата в тех случаях, когда содержание глюкозы в крови понижается (голодание) и энергетические потребности клетки могут быть удовлетворены за счет окисления других субстратов (жирные кислоты). Действительно, при добавлении жирных кислот окисление пирувата в сердечной ткани крыс подавляется (жирные кислоты в этих условиях подвергаются интенсивному окислению) [165, 187].

В ткани почек и особенно печени интенсивно протекает процесс глюконеогенеза [318, 461]. Пируват вовлекается в этот процесс посредством реакции карбоксилирования, катализируемой пируваткарбоксилазой и требующей наличия АТФ. Пируваткарбоксилаза (являющаяся ключевым ферментом глюконеогенеза), так же как и пируватдегидрогеназный комплекс, локализована в митохондриях. Пируватдегидрогеназный комплекс, как уже говорилось выше, инактивируется аденозинтрифосфатом; в присутствии АДФ степень инактивации снижается. Пируваткарбоксилаза, наоборот, проявляет более высокую активность при увеличении отношения АТФ/АДФ [270, 332, 556]. Таким образом, направление, по которому пойдет превращение пирувата — окислительное декарбоксилирование и образование ацетил-КоА или карбоксилирование и образование щавелевоуксусной кислоты, — будет определяться внутримитохондриальным соотношением АТФ и АДФ. В соответствии с таким представлением находятся наблюдения о том, что окисление жирных кислот и других субстратов, сопровождающееся образованием АТФ, снижает скорость окислительного декарбоксилирования пирувата и стимулирует его карбоксилирование [101, 222, 264, 303, 322, 374, 501,

536], а также то, что окисление жирных кислот, как *in vivo*, так и в опытах с гомогенатами, стимулирует глюконеогенез [222, 491, 501, 553].

Непосредственное отношение к рассматриваемому вопросу регуляции процесса окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты имеют исследования Виланда и сотр. [548]. Авторы показали, что пируватдегидрогеназный комплекс ингибируется при добавлении ацетил-КоА (снижение скорости окислительного превращения пирувата было показано и при работе с перфузированным сердцем крысы [166]). Ингибирование конкурентно по отношению к неацетилованному коэнзиму А. Величина  $K_m$  для КоА увеличивается от  $5 \cdot 10^{-6}$  М до  $25 \cdot 10^{-6}$  М. Ингибирование ацетил-коэнзимом А обратимо, и при его удалении из системы активность пируватдегидрогеназного комплекса полностью восстанавливается.

Ферментативная активность пируватдегидрогеназного комплекса снижается наполовину при отношении ацетил КоА/КоА, равном 0,75. Примерно такое же соотношение этих компонентов и в нормальной ткани. Например, в печени крыс оно равно 0,5 [482]. После кормления животных пищей, богатой жирами, а также в результате перфузии печени раствором, содержащим жирные кислоты, соотношение ацетил КоА/КоА в ней увеличивается до 1,5. Приведенные данные указывают на возможность еще одного механизма регуляции активности пируватдегидрогеназного комплекса.

#### ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНЫЙ КОМПЛЕКС *E. coli*

Пируватдегидрогеназный комплекс из *E. coli*, в противоположность пируватдегидрогеназному комплексу, выделенному из животных тканей, не способен фосфорилироваться аденозинтрифосфатом [410, 416]. Однако его активность в значительной степени зависит от присутствия и концентрации целого ряда других метаболитов клетки [454, 455, 457, 471].

## *Влияние ацетил-КоА*

Ацетил-КоА снижает величину ферментативной активности пируватдегидрогеназного комплекса из *E. coli*. Его действие направлено на тиаминовый компонент комплекса — пируватдекарбоксилазу и конкурентно по отношению к субстрату — пировиноградной кислоте [471].

Нуклеозидмонофосфаты — АМФ, ЦМФ и ГМФ, а также неорганический фосфат в значительной степени снижали ингибирующее действие ацетил-КоА (как в опытах с пируватдегидрогеназным комплексом, так и с его пируватдекарбоксилазным компонентом). Неорганический пирофосфат и нуклеозиддифосфаты влияния не оказывали. Значение кажущейся константы Михаэлиса для всех монопнуклеотидов было одинаковым [455].

Отсутствие специфичности в действии нуклеозидмонофосфатов и аналогичный им эффект неорганического фосфата указывают на то, что влияние всех этих компонентов направлено на один и тот же участок молекулы пируватдегидрогеназного комплекса. Идентичен ли он с участком связывания ацетил-КоА, пока неясно. Известно лишь, что кажущаяся константа ингибирования пируватдегидрогеназного комплекса для ацетил-КоА увеличивается в присутствии фосфата примерно в 40 раз [457].

Предполагается, что действие АМФ конкурентно по отношению к ацетил-КоА; кроме того, показано, что в присутствии данного монопнуклеотида сродство пируватдегидрогеназного комплекса к пирувату повышается примерно в шесть раз [471].

## *Действие гуанозинтрифосфата*

Гуанозинтрифосфат, взятый в сравнительно низкой концентрации, ингибирует окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты как в полной системе, так и при исследовании первой стадии реакции, катализируемой пируватдекарбоксилазой [455]. Таким образом, ингибирующее действие ГТФ, как и ацетил-КоА, направлено на тиаминовый компонент комплекса, но в данном случае оно не конкурентно по отношению к пирувату.

Ингибирование гуанозинтрифосфатом специфично, и другие нуклеотидтрифосфаты влияния не оказывали. Не сказывалось и добавление магния в разных концентрациях. Влияние ГТФ в значительной степени снималось

гуанозиндифосфатом (ГМФ и АДФ влияния не оказывали). В равновесных условиях ГТФ связывался с пируватдекарбоксилазой пируватдегидрогеназного комплекса в количестве двух молей на моль белка.

Гуанозинтрифосфат не влиял на степень ингибирования фермента ацетил-коэнзимом А. В свою очередь ингибирующее действие ГТФ не изменялось в присутствии ацетил-КоА [455]. По-видимому, участки связывания двух ингибиторов различны и независимы один от другого. В пользу этого свидетельствуют и данные, приведенные выше: 1) ацетил-КоА, в противоположность ГТФ, действует конкурентно по отношению к пирувату; 2) ингибирование ацетил-коэнзимом А предотвращается нуклеозидмонофосфатами, а ингибирование ГТФ — гуанозиндифосфатом.

*Изменение активности  
пируватдегидрогеназного комплекса  
в присутствии промежуточных продуктов  
гликолиза*

Исследовали влияние фруктозо-1,6-дифосфата, фруктозо-6-фосфата, глюкозо-6-фосфата, 3-фосфоглицериновой кислоты, фосфоенолпирувата, диоксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата. Все эти соединения оказывали активирующее действие на ферментативную активность пируватдегидрогеназного комплекса [471]. Наиболее выраженный эффект наблюдали с фруктозо-1,6-дифосфатом. В его присутствии кажущаяся  $K_m$  для пирувата уменьшалась в четыре раза. Значение кажущейся  $K_m$  для самого фруктозо-1,6-дифосфата составляло величину порядка  $4,5 \cdot 10^{-5}$  М. В присутствии ацетил-КоА она увеличивалась примерно в 9 раз, что как будто бы говорило в пользу конкурентного характера взаимоотношений двух указанных метаболитов. Однако в действительности взаимоотношения между ними более сложные, чем простая конкуренция. На это, в частности, указывает то, что ингибирующее влияние ацетил-КоА все еще проявляется даже при насыщающей концентрации фруктозо-1,6-дифосфата, когда кривая зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации активатора выходит на плато. Действие фруктозо-1,6-дифосфата направлено на пируватдекарбоксилазный компонент пируватдегидрогеназного комплекса [471].

## *Зависимость пируватдегидрогеназной активности от соотношения окисленной и восстановленной форм НАД*

Пируватдегидрогеназный комплекс из *E. coli* сильно ингибируется восстановленной формой НАД [102, 200]. Это объясняется, по-видимому, конкуренцией восстановленного кофермента с его окисленной формой за активный центр фермента, так как степень ингибирования зависит не от абсолютной концентрации НАДН, а от соотношения окисленной и восстановленной форм коэнзима в среде [471]<sup>1</sup>. Отметим, что сродство НАДН к ферменту выше, чем НАД<sup>+</sup>. Это важно при рассмотрении вопроса о возможности регуляции пируватдегидрогеназного комплекса в физиологических условиях путем его ингибирования восстановленной формой кофермента.

Активность пируватдегидрогеназного комплекса, измеряемая при разном соотношении НАД<sup>+</sup>/(НАД<sup>+</sup>+НАДН) в системе, изменяется особенно резко при величине указанного отношения равной 0,8 и выше (рис. 47). Отношение НАД<sup>+</sup>/(НАД<sup>+</sup>+НАДН) в клетках *E. coli*, растущих в аэробных условиях, равно примерно 0,8 [200]. Таким образом, пируватдегидрогеназный комплекс может, по-видимому, участвовать в стабилизации физиологического уровня окисленной и восстановленной форм кофермента в нативной клетке.

Действительно, как это следует из данных, представленных на рис. 47, даже при незначительном увеличении количества НАД<sup>+</sup> ферментативная активность комплекса будет повышаться, в результате чего содержание НАДН увеличится, а соотношение НАД<sup>+</sup>/(НАД<sup>+</sup>+НАДН) вернется к исходному уровню. И наоборот, уменьшение концентрации НАД<sup>+</sup> будет сопровождаться противоположными изменениями в системе, а результат окажется тот же — указанное соотношение различных форм кофермента сохраняется на исходном уровне.

Итак, пируватдегидрогеназный комплекс инактивируется под действием ГТФ, ацетил-КоА и восстановленного НАД. Другими словами, при повышении их концентрации скорость процесса, в результате которого они образуются (непосредственно — ацетил-КоА и НАДН или

<sup>1</sup> Аналогичные данные были получены с пируватдегидрогеназным комплексом, выделенным из *Azotobacter vinelandii* [108].

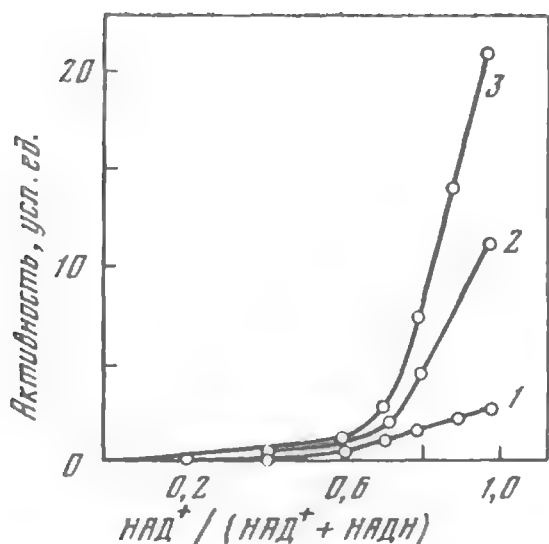


Рис. 47. Влияние пирувата на ферментативную активность пируватдегидрогеназного комплекса из *E. coli*, измеряемую при разных соотношениях окисленной и восстановленной форм НАД [471]

Концентрация пирувата (М):  
1 —  $5 \cdot 10^{-5}$ , 2 —  $5 \cdot 10^{-4}$ ; 3 —  $5 \cdot 10^{-3}$

при дополнительном участии других ферментов — ГТФ), снижается. И наоборот, когда их концентрация уменьшается, активность пируватдегидрогеназного комплекса повышается, и указанные метаболиты накапливаются в среде. Действие ацетил-КоА можно рассматривать как пример регуляции, осуществляющейся по типу обратной связи, так как этот метаболит является конечным продуктом в цепи последовательных реакций, осуществляемых несколькими ферментами пируватдегидрогеназного комплекса, а ингибирует он первый из них — пируватдекарбоксилазу.

Известно, что окисление ацетил-КоА (образующегося из пирувата под действием пируватдегидрогеназного комплекса) в цикле трикарбоновых кислот приводит, в конце концов, к образованию богатых энергией фосфорных соединений. С другой стороны, карбоксилирование пирувата сопровождается образованием щавелевоуксусной кислоты, которая сама может служить исходным субстратом для целого ряда биосинтетических процессов. В клетках *E. coli* образование щавелевоуксусной кислоты происходит таким образом, что сначала пируват под действием пируваткиназы фосфорилируется в фосфоенолпируват, а затем под действием фосфопируваткарбоксилазы карбоксилируется в щавелевоуксусную кислоту [307]. Нельзя исключить, что путь, по которому пойдет превращение пируватдегидрогеназной кислоты (энергетический или пластический), может определяться концентрацией в среде ацетил-КоА и соотношением ГТФ/ГДФ.



Действительно, как уже указывалось выше, скорость окислительного декарбоксилирования пирувата снижается как при повышении концентрации ацетил-КоА, так и с увеличением отношения ГТФ/ГДФ. Эти же условия должны, наоборот, способствовать процессу синтеза щавелевоуксусной кислоты, так как пируваткиназная реакция идет с потреблением энергии, а фосфонолпируват-карбоксилаза в значительной степени активируется ацетил-коэнзимом А [307].

### ОКСОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗНЫЙ КОМПЛЕКС ИЗ ЦВЕТНОЙ КАПУСТЫ

Скорость окислительного декарбоксилирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты существенно повышалась в присутствии АМФ [537]. Наблюдалось также увеличение сродства субстрата к тиаминпирофосфату к оксоглутаратдегидрогеназному комплексу [538].

Действие АМФ на оксоглутаратдегидрогеназный комплекс достаточно специфично. Многие другие нуклеотиды хотя и были способны повышать скорость ферментативной реакции, но в значительно меньшей степени по сравнению с АМФ.

Вопрос о том, на какой из трех компонентов оксоглутаратдегидрогеназного комплекса направлено действие АМФ, специально не исследовали, хотя и было показано, что на липонилдегидрогеназу он не действовал. Можно полагать, что нуклеотид влияет на первый фермент комплекса (оксоглутаратдекарбоксилазу), так как именно с ним связываются тиаминпирофосфат и  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота, сродство которых к оксоглутаратдегидрогеназному комплексу повышается в присутствии АМФ. (Для оксоглутаратдегидрогеназного комплекса, выделенного из *Acinetobacter lwoffii*, это было показано экспериментально [381]).

Максимальная активность оксоглутаратдегидрогеназного комплекса выявляется только в том случае, если наряду с тиаминпирофосфатом добавляли и двухвалентные катионы. Обычно в опытах использовали магний, хотя и другие ионы двухвалентных металлов могли выполнять роль активаторов, причем кальций даже более эффективно, чем магний. Стронций был менее активен.

Таблица 19

Влияние АМФ на активность оксoglутаратдегидрогеназного комплекса, измеряемую в присутствии различных катионов [538]

| Добавлен металл ( $1 \cdot 10^{-2}$ М) | Величина ферментативной активности, мкмоль НАД, восстановившегося за 1 мин. |                                          |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|                                        | в отсутствие АМФ                                                            | в присутствии АМФ ( $3 \cdot 10^{-4}$ М) |
| Без добавок                            | 2,17                                                                        | 6,41                                     |
| Магний хлористый                       | 5,82                                                                        | 16,51                                    |
| Кальций хлористый                      | 9,71                                                                        | 15,13                                    |
| Стронций хлористый                     | 3,77                                                                        | 14,03                                    |

Добавление АМФ во всех случаях сопровождалось повышением величины определяемой активности (табл. 19).

При этом существенная разница в активности, наблюдаемая в пробах с различными катионами, полностью нивелировалась.

#### АЦЕТОЛАКТАТСИНТЕТАЗА

Ацетолактатсинтетаза, обнаруженная в ряде микроорганизмов [86, 197, 400, 489, 520, 521] и в растениях [356], катализирует простое декарбоксилирование пировиноградной кислоты и последующий перенос «активного ацетальдегида» на вторую молекулу пирувата или на  $\alpha$ -кетомасляную кислоту. В первом случае образуется  $\alpha$ -ацетомолочная кислота, а во втором —  $\alpha$ -ацетоксимасляная. Эти кислоты через ряд последовательных стадий превращаются соответственно в валин и изолейцин.

Таким образом, реакции, катализируемые ацетолактатсинтетазой, являются первыми в цепи последовательных реакций, приводящих к синтезу валина или изолейцина. Фермент ингибируется этими же аминокислотами, причем действие валина выражено сильнее. Ингибирование неконкурентно по отношению к пирувату.

Все эти данные получены на интактных митохондриях. После выделения и частичной очистки ацетолактатсинтетазы его чувствительность к валину и изолейцину уменьшается во много раз, а сродство к коферменту (тиаминпирофосфату) повышается [170].

Высокоочищенные кристаллические препараты ацетолактатсинтетазы из *Aerobacter aerogenes* [486] в аце-

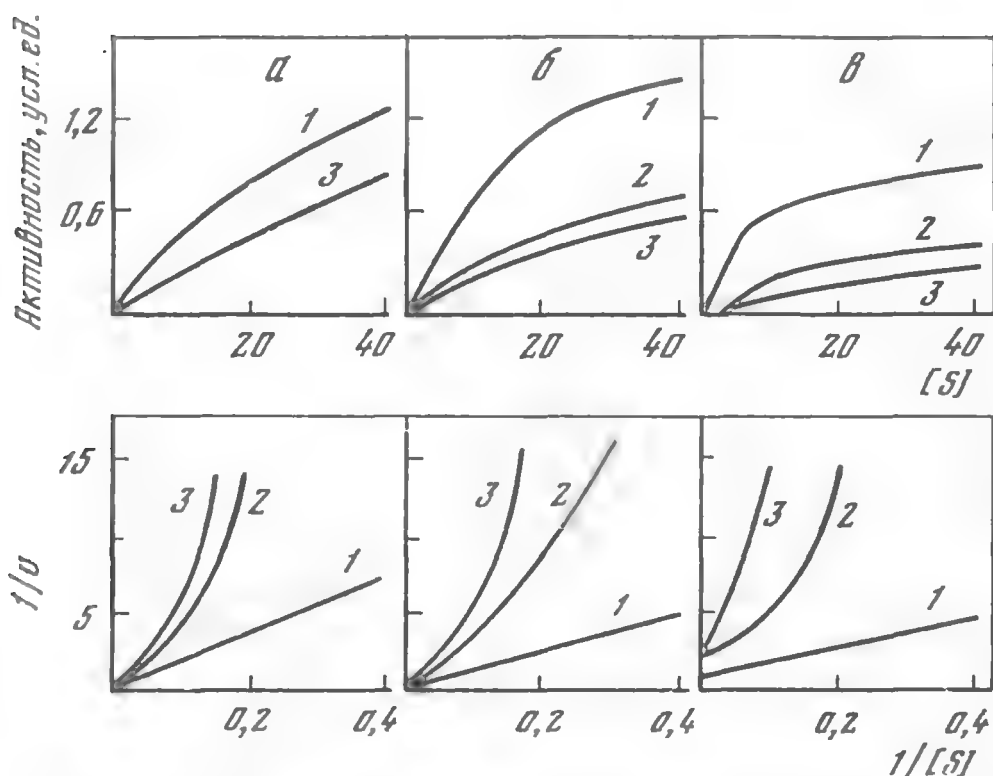


Рис. 48. Влияние ацетата и фосфата на активность ацетолактаткиназы при различных значениях рН [487]

*а* — рН 5,4; *б* — рН 5,8; *в* — рН 6,2; Буфер: 1 — ацетатный; 2 — ацетатный + фосфатный; 3 — фосфатный

татном буфере показывают максимальную активность при рН 5,8, а в фосфатном — при рН 5,4 [487]. Во втором случае (как и во всех других исследованных буферах) зависимость скорости реакции от концентрации субстрата имеет сигмоидальный характер (рис. 48). В ацетатном буфере — она гиперболическая. Добавление фосфата в пробы с ацетатом не только изменяет характер кинетической кривой, но и уменьшает скорость ферментативной реакции, что особенно отчетливо видно в экспериментах, поставленных при рН 5,8 и выше (см. рис. 48, *б*, *в*). В присутствии сульфата, который действует аналогично фосфату, коэффициент Хилла был значительно больше единицы, что указывает на наличие в энзиме как минимум двух субстрат-связывающих участков.

Активирующее действие ацетата достаточно специфично. Еще лишь монохлорацетат активировал фермент, в то время как лактат, цитрат, сукцинат, малат, ацета-

мид и ацетилфосфат такой способностью не обладали.

Концентрация ацетата в клетках *A. aerogenes* достаточно высока [75] и сопоставима с той, которая активизирует ацетолактатсинтетазу [487]. Нельзя поэтому исключить возможность регуляции активности данного фермента ацетатом в физиологических условиях.

В *трис*-буфере при pH 6 в ацетолактатсинтетазе титруются примерно с одинаковой скоростью три сульфгидрильные группы. Активность фермента при этом снижается, но его кинетическая характеристика, получаемая в разных буферах, не изменяется. В присутствии додецилсульфата натрия в молекуле ацетолактатсинтетазы открывается еще одна SH-группа. То же самое наблюдается, если вместо додецилсульфата в титруемую пробу добавить ацетат [506]. Действие ацетата специфично, так как ни ацетамид, ни пропионат совершенно не влияют на количество титруемых групп в ферменте.

Таким образом, три сульфгидрильные группы находятся на поверхности белковой молекулы ацетолактатсинтетазы и могут быть легко оттитрованы, а четвертая — замаскирована, и для ее обнаружения необходима конформационная перестройка белковой молекулы. В настоящее время трудно сказать, имеется ли какая-либо связь между изменением конформации, повышением реакционности сульфгидрильной группы и изменением кинетической характеристики фермента в присутствии ацетата.

### ТРАНСКЕТОЛАЗА

Для выделения и очистки транскетолазы из дрожжей обычно используют методику Рекера и сотр., предложенную еще в 1955 г. [193] и затем модифицированную ими же в 1958 г. [484]. Оказалось, однако, что получаемые при этом кристаллические препараты фермента не были однородны и содержали значительное количество глицеральдегидфосфатдегидрогеназы [30, 280, 424, 504]. Количество ее варьировало от препарата к препарату и существенно зависело от условий выращивания дрожжей. Введя в оригинальную методику дополнительную стадию дробного многократно повторяемого фракционирования щелочным раствором сульфата аммония, удалось полностью избавиться от глицеральдегидфосфатдегидро-

геназы и получить однородные препараты транскетолазы [30, 280].

Наличие глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в препаратах транскетолазы казалось неожиданным, так как, судя по литературным данным о свойствах глицеральдегидфосфатдегидрогеназы [273, 317, 526], этот фермент должен был легко отделяться от транскетолазы в процессе хроматографирования на ДЭАЭ-целлюлозе и последующего обычного фракционирования сульфатом аммония — стадии очистки, предусматриваемые методикой Рекера и сотр. Вопрос этот был важен не только с чисто практической точки зрения — для получения высокоочищенных, однородных препаратов транскетолазы, но мог представлять и общий теоретический интерес. Поэтому мы и занялись изучением его [30, 280].

На предпоследней стадии очистки транскетолазы по методу Рекера и сотр. препарат фермента пропускается через колонку, заполненную ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной  $5 \cdot 10^{-3}$  М кальций-фосфатным буфером, рН 7,7. Элюция осуществляется тем же буферным раствором. Именно на этой стадии уже предполагалось получить разделение транскетолазы и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. Как, однако, показал детальный анализ фракций элюата, оба фермента снимаются вместе. При этом транскетолаза элюируется с колонки в виде одного пика активности, а глицеральдегидфосфатдегидрогеназа — в виде трех, каждый из которых соответствует, по-видимому, индивидуальной форме фермента.

Анализ белковых фракций, снимаемых с колонки при последующей элюции повышающимися концентрациями хлористого калия, не прояснил картины. Единственно, что удалось обнаружить — это еще одну форму глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. Данная форма фермента при хроматографировании на КМ-сефадексе при рН 6,0 не связывалась ионообменником и сходила с колонки уже при посадке ферментного препарата, в то время как три другие формы, а также транскетолаза снимались лишь при градиентной элюции. Качественное разделение активностей двух ферментов было такое же, как и в первом случае, когда использовали ДЭАЭ-целлюлозу. И опять наблюдали совпадение одного из пиков активности глицеральдегидфосфатдегидрогеназы с пиком активности транскетолазы.

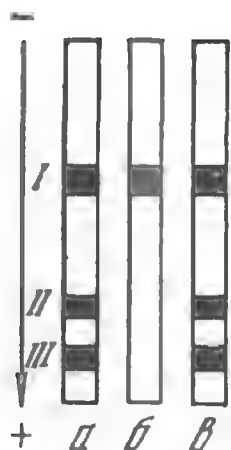


Рис. 49. Электрофорез препарата транскетолазы в полиакриламидном геле [280]

Гистохимическое выявление ферментативной активности: *а* — в системе для выявления транскетолазы; *б* — в той же системе, но без добавления вспомогательного фермента — глицеральдегидфосфатдегидрогеназы; *в* — в системе для выявления глицеральдегидфосфатдегидрогеназы

Препарат фермента после очистки его на ДЭАЭ-целлюлозе был подвергнут электрофоретическому разделению в полиакриламидном геле. Затем гель прокрашивали на белок и гистохимически выявляли наличие активностей обоих ферментов в белковых зонах [280].

Индивидуальные активности транскетолазы и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, естественно, выявлялись в соответствующих системах, обычно используемых для гистохимического определения указанных ферментов (рис. 49, *а*, *в*). Оказалось при этом, что одна из белковых фракций интенсивно прокрашивалась и в том случае, если использовали систему для выявления транскетолазы, из которой был исключен один из компонентов — мышечная глицеральдегидфосфатдегидрогеназа.

Приведенные экспериментальные данные являются веским основанием для того, чтобы считать зону I белковой фракцией, представляющей собой комплекс двух функционально связанных ферментов.

Фосфоглицериновый альдегид — продукт транскетолазной реакции, образующийся под действием одного из ферментов комплекса, — не высвобождаясь в среду, немедленно претерпевает дальнейшие превращения, катализируемые другим ферментом, входящим в состав комплекса. Результатом непрерывной последовательности реакций, катализируемой комплексом двух функционально связанных между собой ферментов, является гистохимическое прокрашивание белковой фракции в опыте, изображенном на рис. 49, *б*.

С приведенными рассуждениями хорошо согласуется тот факт, что хотя в зонах II и III оба фермента очень

близко расположены и их разделение лишь намечается, тем не менее эти зоны, в противоположность зоне I, не прокрашиваются в системе для выявления транскетолазы, из которой исключена мышечная глицеральдегидфосфатдегидрогеназа. Очевидно, в данном случае фосфоглицериновый альдегид, образующийся под действием транскетолазы, успевает выделиться в окружающую среду, прежде чем подвергнется действию глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, несмотря на то, что на электрофореграмме оба фермента почти соприкасаются.

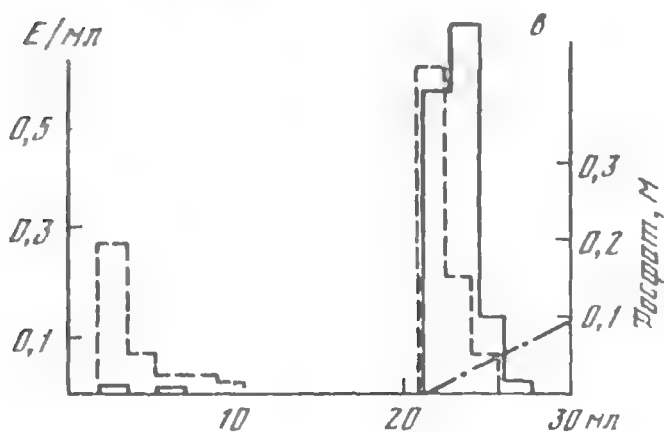
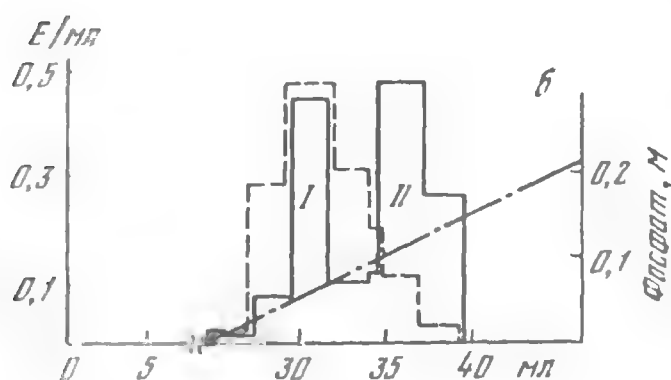
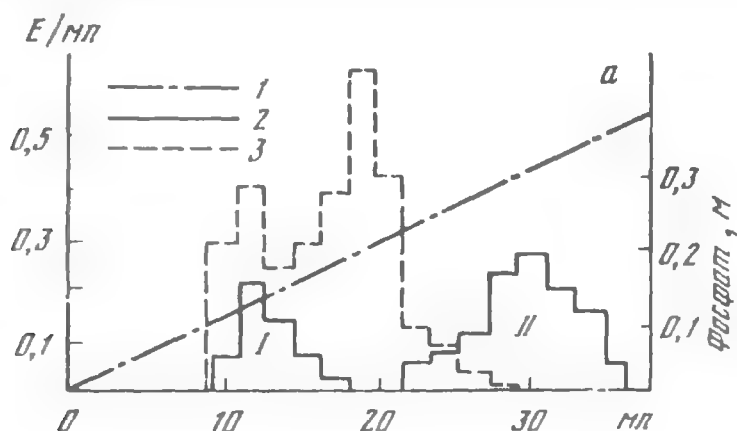
Дальнейшее исследование причин нахождения глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в кристаллических препаратах транскетолазы, получаемых согласно методике Рекера и сотр., было продолжено опять с использованием метода ионообменной хроматографии. Как уже указывалось выше, в процессе очистки на ДЭАЭ-целлюлозе вместе с транскетолазой элюировалась и глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, которая на хроматографическом профиле выявлялась в виде трех форм. Две из них совпадали с пиком активности транскетолазы. Третья форма снималась с колонки последней и лишь частично перекрывала пик активности транскетолазы. Она могла быть удалена последующим фракционированием сульфатом аммония (см. методику Рекера и сотр. [484]). Две другие формы выпадали в осадок вместе с транскетолазой.

Была сделана попытка отделить их на ионообменных колонках. Вначале работу проводили в диапазоне рН 7—9, где транскетолаза наиболее стабильна. При рН 7,6 на хроматографическом профиле были видны перекрывающиеся пики транскетолазы и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. Второй пик, резко асимметричный, представлял собой смесь двух форм глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. Их четкое разделение происходило при использовании ДЭАЭ-сефадекса, уравновешенного  $2 \cdot 10^{-2}$  М трис-буфером, рН 9, и градиентной элюции трис-буфером, исходная величина рН которого равнялась 7. При этом одна из форм глицеральдегидфосфатдегидрогеназы практически полностью отделялась от транскетолазы, в то время как хроматографический профиль другой формы практически полностью совпадал с хроматографическим профилем транскетолазы [30].

Это максимальный результат, которого удалось достичь, работая в диапазоне рН 7—9, используя различ-

ные ионообменники и широко варьируя условиями хроматографирования. При рН 9 удалось, по крайней мере, четко отделить одну из форм глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. В других случаях не происходило и этого.

Хроматографирование ферментных препаратов при низких значениях рН дало следующие результаты. На рис. 50, а приведены экспериментальные данные, получен-





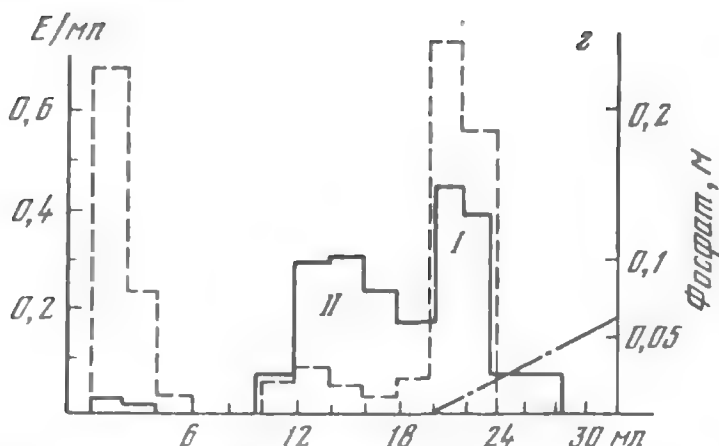


Рис. 50. Хроматографирование препарата транскетолазы на КМ-сефадексе [30]

Колонка уравновешена  $4,5 \cdot 10^{-2}$  М калий-фосфатным буфером; *a* — pH 5,5; *b* — pH 6,0; *в* — pH 6,5; *г* — 6,65; 1 — концентрация элюирующего буфера, 2 — транскетолазная активность; 3 — глицеральдегидфосфатдегидрогеназная активность. По оси ординат — величина ферментативной активности

ные при использовании КМ-сефадекса, уравновешенного  $5 \cdot 10^{-2}$  М калий-фосфатным буфером, pH 5,5. Видно полное разделение изоформ транскетолазы. Неполностью, но достаточно хорошо разделяются и формы глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, причем одна из них элюируется с колонки вместе с изоформой I транскетолазы.

Интересные данные были получены при незначительных изменениях pH калий-фосфатного буфера, которым уравнивалась колонка. Повышение pH всего на половину единицы (pH 6 на рис. 50, *б* по сравнению с pH 5,5 на рис. 50, *а*) приводило к тому, что формы глицеральдегидфосфатдегидрогеназы переставали разделяться и обе теперь элюировались с колонки вместе с изоформой I транскетолазы (см. рис. 50, *б*). Другими словами, положение свободной формы глицеральдегидфосфатдегидрогеназы на хроматографическом профиле при повышении pH смещалось влево. В том же направлении, но в разной степени происходило смещение и всех других белковых фракций (сравни рис. 50, *б* и *а*).

Отмеченная тенденция продолжала выявляться и при дальнейшем повышении pH буфера, которым уравнивалась колонка. Теперь (при pH 6,5) свободная форма глицеральдегидфосфатдегидрогеназы вообще не связывалась ионообменниками и снималась с колонки уже

при посадке (рис. 50, в), а пики транскетолазной активности сливались в один. И наконец при рН 6,65 изоформа II транскетолазы элюировалась раньше, чем изоформа I (рис. 50, г), в противоположность тому, что наблюдалось при рН 5,5 (см. рис. 50, а).

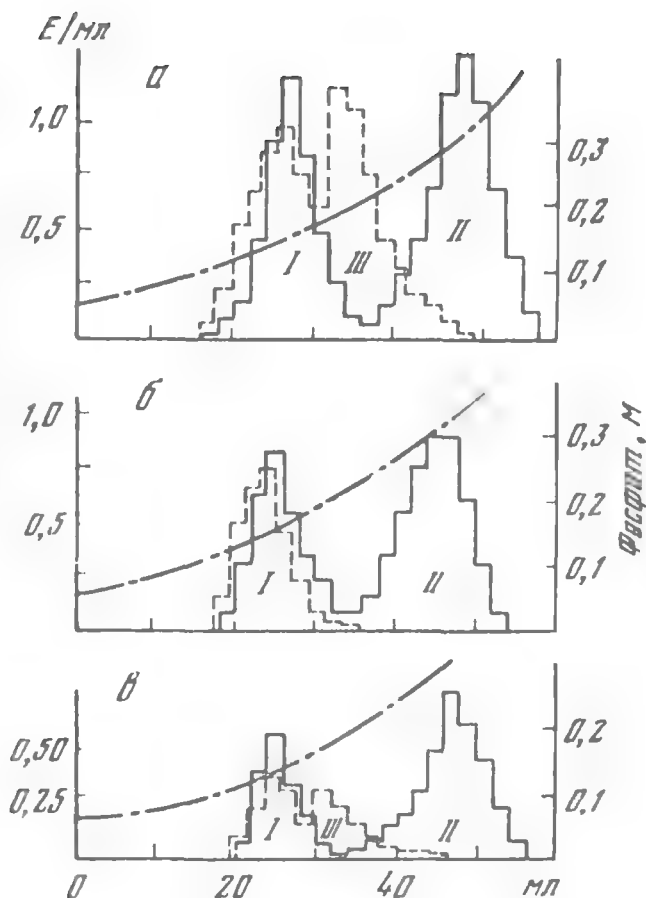
При сопоставлении данных, представленных на рис. 50, а, б, в, г, отчетливо видно, что изменение рН буфера, которым уравнивается колонка, резко сказывается на хроматографическом поведении отдельных белковых фракций ферментного препарата. Происходит столь значительное перемещение их вдоль всего хроматографического профиля, что качественно меняется вся наблюдаемая картина. Например, в одних условиях раньше снимается изоформа I транскетолазы, а в других — изоформа II. То же самое относится и к двум формам глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. Несмотря на это, всегда обнаруживалась белковая фракция, содержащая как транскетолазу, так и глицеральдегидфосфатдегидрогеназу, причем пики активностей ферментов на хроматографическом профиле всегда совпадали.

Приведенные экспериментальные данные убедительно подтверждают выдвинутое выше предположение о том, что в недостаточно очищенных препаратах транскетолазы содержится комплекс двух связанных между собой ферментов — транскетолазы и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. В пользу этого же говорят следующие экспериментальные данные [280].

Если ферментный препарат, который при хроматографировании на КМ-сефадексе в кислой среде даст обычную хроматографическую картину, т. е. наличие трех пиков, соответствующих изоформе II транскетолазы, свободной форме глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и содержащий обе активности (рис. 51, а), предварительно подвергнуть подробному фракционированию сульфатом аммония и только затем напести на колонку, то свободная форма глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в элюате не обнаруживается (рис. 51, б). При фракционировании сульфатом аммония эта форма осталась в маточном растворе. Если препарат фермента, полученный в опыте, представленном на рис. 51, б, и не содержащий свободной формы глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, выдержать в растворе сульфата аммония 40 — 50%-ного насыщения в течение определенного времени,

Рис. 51. Хроматографирование препарата транскетотазы на КМ-сефадексе [280]

Колонка уравновешена  $4,5 \cdot 10^{-2}$  М калий-фосфатным буфером, рН 5,5; а — исходный препарат фермента; б — после дробного фракционирования сульфатом аммония; в — что и б, но с последующим вытерживанием в щелочном растворе сульфата аммония. Обозначения, как на рис. 50



после чего хроматографировать при тех же условиях, что и раньше, то свободная форма глицеральдегидфосфатдегидрогеназы опять обнаруживается (см. рис. 51, в).

Повторяя описанную процедуру, можно получить ферментный препарат, вообще не содержащий глицеральдегидфосфатдегидрогеназу и элюирующийся с колонки двумя пиками, соответствующими двум индивидуальным изоформам транскетотазы (см. рис. 11, а).

Таким образом, «связанная форма» глицеральдегидфосфатдегидрогеназы — это та же свободная форма фермента, только находящаяся в комплексе с транскетотазой. Под действием сульфата аммония при рН выше 7 она высвобождается из комплекса и может быть отделена от транскетотазы хроматографически (см. рис. 51) или дробным фракционированием сульфатом аммония. Именно это и позволяло получать однородные препараты транскетотазы, используя метод дробного фракционирования, когда еще не было известно о существовании комплекса. Собственно, этот же метод используется и в

настоящее время, только в него добавлено предварительное, до фракционирования, выдерживание ферментного препарата в щелочном растворе сульфата аммония.

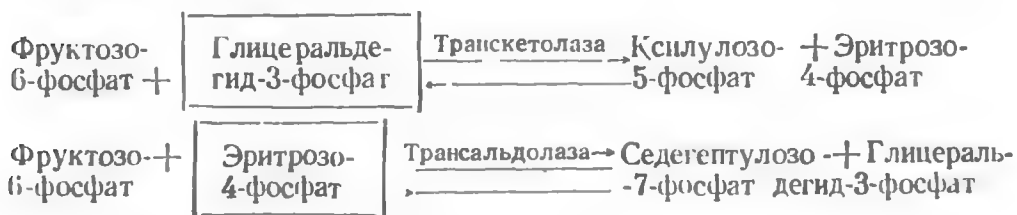
Следует заметить, что комплекс с глицеральдегидфосфатдегидрогеназой способна образовывать только одна из изоформ транскетолазы — изоформа I. Изоформа II транскетолазы всегда присутствует в свободном виде [30]. В условиях проведения эксперимента, показанных на рис. 51, хроматографического разделения изоформы I транскетолазы и комплекса транскетолаза — глицеральдегидфосфатдегидрогеназа не происходило. Они элюировались одним белковым пиком. И еще один факт — каталитическая активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, связанной в комплексе с транскетолазой, значительно повышается при добавлении в систему сульфгидрильных соединений. Эффект с  $\beta$ -меркаптоэтанолом был выражен в несколько раз сильнее по сравнению с цистеином или восстановленным глутатионом [30]. После высвобождения из комплекса способность активироваться сульфгидрильными соединениями терялась. В процессе хранения она вновь восстанавливалась. Но в данном случае, в противоположность глицеральдегидфосфатдегидрогеназе, связанной с транскетолазой, все сульфгидрильные соединения действовали с одинаковой эффективностью. В то же время наличие в системе  $\beta$ -меркаптоэтанола никак не сказывалось на хроматографическом поведении ни свободной глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, ни ее комплекса с транскетолазой.

Способность комплексоваться с другими ферментами свойственна не только транскетолазе, но и другому ферменту пентозного пути превращения углеводов — трансальдолазе [272]<sup>1</sup>. На основании собственных экспериментальных данных авторы указанной работы делают вывод, что в неочищенных ферментных препаратах из дрожжей трансальдолаза находится в виде комплекса с транскетолазой. Существование такого комплекса интересно, помимо всего прочего, с той точки зрения, что позволяет объяснить давно полученные и парадоксальные, как тогда казалось, экспериментальные данные. Заключаются они в следующем [98, 387].

---

<sup>1</sup> А также, очевидно, ферментам, не связанным с пентозным путем превращения углеводов [112, 153, 412].

При добавлении к фруктозо-6-фосфату двух высокоочищенных ферментов — транскетолазы и трансальдолазы — наблюдалось быстрое его исчезновение, причем сразу с максимальной скоростью. Одновременно накапливался седогептулозо-7-фосфат, что указывало на протекание двух реакций:



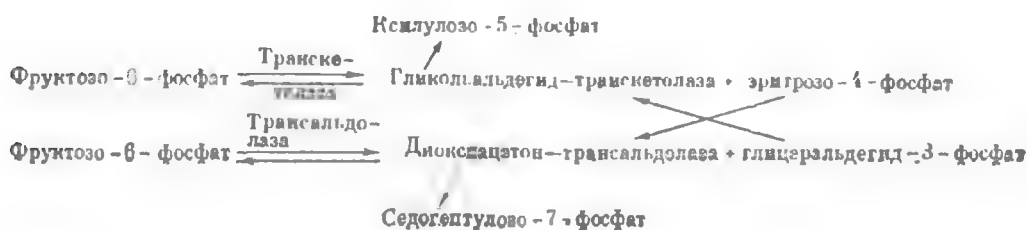
В сумме:



Это подтвердилось при химическом анализе реакционной смеси в процессе расщепления фруктозо-6-фосфата в данной системе. Но для осуществления указанных реакций необходимо наличие в среде, кроме субстрата-донора (в данном случае его функцию выполнял фруктозо-6-фосфат), еще и субстратов-акцепторов: глицеральдегид-3-фосфата — для транскетолазной реакции и эритрозо-4-фосфата — для трансальдолазной реакции. Но их не было в исходной реакционной смеси. Не было также и других возможных субстратов-акцепторов, что было специально проверено. Кроме того, фруктозо-6-фосфат не подвергался никаким превращениям, если добавляли только транскетолазу или только трансальдолазу, что находится в полном соответствии со спецификой реакций, катализируемых данными ферментами.

Какое-то количество субстратов-акцепторов могло бы, в принципе, образоваться из фруктозо-6-фосфата под действием только транскетолазы и только трансальдолазы (соответственно эритрозо-4-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата). Но их было бы так мало, что они не смогли бы выполнять функцию субстратов-акцепторов в соответствующей реакции. Например, концентрация эритрозо-4-фосфата, образовавшегося из фруктозо-6-фосфата под действием транскетолазы, была бы не выше  $1 \cdot 10^{-8}$  М (именно такая концентрация транскетолазы была в рассматриваемых опытах). А это примерно в 1000 раз меньше, чем величина  $K_m$  для этого субстрата с трансальдолазой [387].

Таким образом, приведенные экспериментальные данные очень трудно объяснить исходя из обычных представлений о действии двух индивидуальных ферментов, находящихся в растворе. Однако с точки зрения существования комплекса транскетолазы с трансальдолазой, о чем говорилось выше, это сделать значительно проще. Имеется в виду возможность сопряженного действия указанных ферментов без высвобождения в среду промежуточных продуктов реакции. В этом случае каждый из этих промежуточных продуктов, образуясь под действием одного из ферментов комплекса, сразу же вступал бы в реакцию, катализируемую другим ферментом комплекса.



Такое сопряженное действие указанных ферментов представляется важным с биологической точки зрения, так как оно не зависит от концентрации свободных субстратов-акцепторов в среде и может так же эффективно происходить и в их отсутствие, при наличии лишь только одного фруктозо-6-фосфата. Особенно важно это еще и потому, что образование фосфоэнтоз в живом организме осуществляется за счет неокислительных реакций пентозного пути превращения углеводов — транскетолазной и трансальдолазной, а исходный субстрат в этом процессе — фруктозо-6-фосфат [6, 90, 224, 340, 453, 473].

Раньше было принято делить все ферменты на две группы — «растворимые» и «нерастворимые», подразумевая под последними ферменты, включенные в состав различных структурных компонентов клетки. Последнее время, однако, накапливается все больше данных, указывающих на условность такого деления. По-видимому, все ферменты или по крайней мере — большинство из них так или иначе структурно объединены между собой. Или в простые функциональные комплексы, или в более сложные полифункциональные единицы. Экспериментальные данные, приведенные в настоящем разделе, — лишь тому подтверждение.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полный распад транскетолазы пекарских дрожжей на субъединицы, как при щелочной денатурации, так и при сильном разведении ферментного раствора, осуществлялся в отсутствие добавленного извне меркаптоэтанола или других каких-либо сульфгидрильных соединений [71, 119]. Это указывает на то, что субъединицы в молекуле транскетолазы не связаны между собой дисульфидными связями. Аналогичный вывод (об отсутствии межсубъединичных дисульфидных связей) следует и из экспериментальных данных, полученных с другими тиаминовыми ферментами [10, 68, 99, 177, 512, 531].

Способность к спонтанной диссоциации на субъединицы, в результате чего устанавливается равновесие между мономерной и олигомерной формами фермента, характерна не только для транскетолазы, но и для других представителей тиаминовой группы ферментов. Это четко показано для оксоглутаратдекарбоксилазного компонента оксоглутаратдегидрогеназного комплекса грудной мышцы голубя [10], а также для пируватдекарбоксилазы пекарских дрожжей [177].

В последнем случае равновесие димер $\rightleftharpoons$ мономер сдвигается вправо при смещении рН от 7,0 в щелочную сторону. И наоборот, наблюдается сдвиг в левую сторону, когда в систему добавляли кофакторы (тиаминпирозинфосфат и магний). В их присутствии и при постепенном изменении рН от 8,5 до 6,5 фермент полностью переходил в димерную форму и по свойствам не отличался от исходного нативного фермента. В тех же условиях, но в отсутствие кофакторов также наблюдался переход мономерной формы в димерную, но только не полностью.

Щелочная среда способствовала диссоциации на субъединицы и апотранскетолазы пекарских дрожжей. Диссоциация наблюдалась уже при рН 7,6 (при низкой концентрации фермента), и с повышением рН она усиливалась. Наличие в среде кофакторов — тиаминпирозинфосфата и двухвалентных катионов, взятых в насыщающих концентрациях, благоприятствовало переходу фермента в димерную форму [2], однако часть его все еще присутствовала в мономерной форме, в противоположность тому, что только что говорилось для пируватдекарбоксилазы. Причина этого может заключаться в том, что эксперименты проводили в неидентичных условиях: с пируватдекарбоксилазой — при рН 6,5 (оптимум каталитической активности данного фермента), а с транскетолазой — при рН 7,6 (оптимум транскетолазной активности). Таким образом, во втором случае значение рН не оптимально для димерной формы фермента.

Нельзя исключить и такую возможность, что субъединицы транскетолазы более лабильны, чем димерная форма (глава II). В процессе проведения экспериментов по седиментационному равновесию фермент длительное время (около суток) находился при комнатной температуре в условиях низкой его концентрации в растворе. Это могло явиться причиной частичной денатурации субъединиц, что, в свою очередь, могло привести к потере кофакторами способности взаимодействовать с такими субъединицами и влиять на их ассоциацию с образованием димерной формы фермента. Косвенным подтверждением этого может служить то, что транскетолазная активность, измеренная в конце проведения опытов по седиментационному равновесию, оказывалась заниженной по сравнению с исходной.

В одной из последних работ, выполненных в лаборатории Сейбла [119], опыты по седиментационному равновесию ставили не при комнатной температуре (как те, что описывались выше), а при 5°. В таких условиях распада холотранскетолазы на субъединицы не наблюдалось. Это можно объяснить тем, что более низкая температура, во-первых, благоприятствует смещению равновесия форм транскетолазы в сторону образования димера, а во-вторых, повышает стабильность мономерной формы фермента и сохраняет их нативные свойства.



Нативная молекула пируватдекарбоксилазного компонента пируватдегидрогеназного комплекса грудной мышцы голубя способна спонтанно диссоциировать с образованием компонента с половинным молекулярным весом. Обе белковые фракции (исходный фермент и фракция, образовавшаяся в процессе его диссоциации) характеризуются каталитической активностью, лишь незначительно различающейся по абсолютной величине [68]. Это как будто бы указывало на то, что каталитическую функцию может выполнять не только нативная молекула фермента, но и отдельные ее функциональные единицы (состоящие каждая из двух полипептидных цепей —  $\alpha$  и  $\beta$ ). Следует, однако, учесть, что при определении ферментативной активности в систему добавляли кофакторы, которые способны переводить мономерную форму тиаминовых ферментов в димерную. Нельзя исключить, что в данном случае реализуется именно эта возможность и в действительности в обеих белковых фракциях, при измерении их каталитической активности, мы имеем дело с нативной формой фермента, представленной двумя функциональными единицами. Тем более показано, что хотя отдельные функциональные единицы (типа  $\alpha$ ,  $\beta$ ) способны связываться с липоилтрансацилазой и в присутствии липоилдегидрогеназы при этом образуется пируватдегидрогеназный комплекс, но каталитической активностью он не обладает. Активность выявляется только в том случае, если в формировании комплекса участвует форма фермента, имеющая структуру  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\beta$ , т. е. состоящая из двух функциональных единиц.

С другой стороны, диссоциация пируватдекарбоксилазы пекарских дрожжей на субъединицы в слабощелочной среде сопровождается потерей ферментативной активности [177]. В тех же условиях пируватдекарбоксилазный компонент пируватдегидрогеназного комплекса *E. coli* также распадается на две идентичные субъединицы [142, 531], которые могут быть отделены от исходной формы фермента с помощью гель-фильтрации на сефадексе. При этом оказалось, что ферментативная активность обнаруживается только в одной белковой фракции — в той, которая содержит димерную форму фермента. Фракция, соответствовавшая мономерной форме, была каталитически неактивна [142]. На основании этих данных авторы приходят к выводу, что мономер-

ная форма фермента не может выполнять каталитическую функцию. Однако и такое заключение нельзя считать однозначным, учитывая более высокую лабильность субъединиц по сравнению с нативной (димерной) формой тиаминовых ферментов.

Несколько сложнее обстоит дело с транскетолазой пекарских дрожжей. Для определения каталитической активности данного фермента он обычно добавляется в реакционную смесь в количестве нескольких микрограммов на 1 мл. В то же время было показано, что даже при большей концентрации апотранскетолазы в растворе она в значительной степени, судя по данным седиментационного равновесия, присутствует в мономерной форме. При добавлении кофакторов сдвиг равновесия в сторону димера хотя и происходит, но лишь частично [2].

Здесь могут иметь место по меньшей мере три возможности:

1) каталитической активностью характеризуется только мономерная форма транскетолазы и именно она присутствует в растворе при низкой концентрации белка, независимо от того, есть в системе кофакторы или нет;

2) каталитическая активность присуща в равной степени как мономеру, так и димеру;

3) активна только димерная форма фермента, для образования которой из мономеров (в условиях низкой концентрации фермента) необходимо наличие в среде кофакторов. Частичный распад холофермента на субъединицы в этих условиях можно было бы объяснить большей лабильностью субъединиц и неспособностью их после денатурации взаимодействовать с кофакторами. И как следствие — неспособность кофакторов переводить такие субъединицы в димерную форму. Принципиальная возможность частично денатурированных субъединиц к ассоциации при этом могла бы сохраниться и реализовываться в условиях относительно высокой концентрации фермента, но без участия кофакторов.

Первую из трех указанных возможностей в настоящее время можно, по-видимому, исключить, так как каталитическая активность димерной формы транскетолазы была недавно показана [119].

Согласно литературным данным, распад тиаминовых ферментов на субъединицы осуществляется в тех же

условиях, что и отщепление от них кофермента. Во всяком случае это оказывалось справедливым для тех ферментов, которые могли быть проанализированы в этом плане.

Обычно холофермент и димерная форма фермента наиболее стабильны в слабокислой среде, примерно при рН 5,5—6,5. С повышением рН начинается постепенная диссоциация на субъединицы и отщепление кофермента. Оба процесса усиливаются с переходом в более щелочную среду [2, 18, 142, 177, 180, 193, 216, 333, 361, 493, 531].

Переход стабильной формы холофермента в нестабильную в кислой среде осуществлялся более резко. Так, например, ферментные препараты, выделенные из сердечной мышцы свиньи и осуществляющие окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, после их выдерживания при рН 4,8 все еще проявляют максимальную активность и без добавления извне тиаминопирофосфата. Смещение рН всего лишь на 0,2 в кислую область сопровождается значительным отщеплением кофермента [182]. По существу аналогичные данные были получены и с другими тиаминовыми ферментами [180, 493, 494]. Полное отщепление тиаминопирофосфата от различных ферментов происходило, как правило, в диапазоне рН 4,5—5,5.

И еще один факт, заслуживающий внимания: *трис* конкурирует с тиаминопирофосфатом за активный центр фермента (другими словами — способствует отщеплению кофермента от белка) и он же вызывает распад димерной формы фермента на субъединицы [21, 177].

Таким образом, кажется очевидным, что процессы распада тиаминовых ферментов на субъединицы и отщепления кофермента от холофермента тесно связаны между собой. Что в данном случае является первичным, а что вторичным — сказать в настоящее время трудно.

Транскетолаза пекарских дрожжей состоит из двух субъединиц и имеет два активных центра [17, 119, 219, 279]. Транскетолаза, выделенная из листьев шпината, является мономером и содержит в составе своей молекулы один активный центр [246]. Данные о количестве активных центров у других тиаминовых ферментов менее определены. Так, свежевыделенные препараты пи-

руватдекарбоксилазы пивных дрожжей (фермент является димером) содержат около 3 молей тиаминпирофосфата на моль белка и показывают примерно 70% активности от максимальной, т. е. измеренной с добавлением в среду свободных кофакторов [516]. Отсюда авторы делают заключение, что молекула фермента может связывать 4 молекулы тиаминпирофосфата, причем, судя по результатам измерения активности, все они, по-видимому, выполняют каталитическую функцию. Опыты с необратимым ингибитором — глиоксиловой кислотой [507] — подтверждают эту точку зрения. Наряду с этим в исследованиях, проведенных с тем же ферментом, показано наличие в нем двух (или точнее — как минимум двух) субстрат-связывающих участков на димерную молекулу белка [96, 510]. Столько же участков связывания для субстрата получено и при исследовании пируватдекарбоксилазного компонента пируватдегидрогеназного комплекса *E. coli* [457], молекула которого также построена из двух субъединиц. Таким образом, во всех исследованных случаях на одну субъединицу приходится как минимум один активный центр.

Итак, с одной стороны, при физиологических условиях тиаминовые ферменты (лишенные тиаминпирофосфата) находятся в растворе как в мономерной форме, так и в димерной (а в некоторых случаях исключительно в виде мономерной), причем субъединицы, по-видимому, идентичны, и на каждую приходится как минимум один активный центр. А с другой стороны — кофермент способствует ассоциации мономеров в димер (или предотвращает распад димерной формы на субъединицы), и до сих пор неизвестно, способны ли отдельные субъединицы катализировать ферментативные реакции. Исключение составляет лишь транскетолаза из листьев шпината, которая активна в мономерной форме. Но нет данных и о том, что этот фермент может существовать в димерной форме.

Активные центры транскетолазы пекарских дрожжей сильно различаются по величинам константы связывания для тиаминпирофосфата [288]. Возможно, поэтому примерно половина кофермента отщепляется уже в процессе выделения и очистки фермента, а оставшаяся часть может быть удалена лишь при использовании достаточно жестких воздействий.

Неравнозначность кофермент-связывающих участков предполагается и для других тиаминовых ферментов (хотя количественные исследования в данном случае не проводились). Так, например, 6-метил-тиаминпирофосфат, аналог кофермента, в шестое положение пиримидинового кольца которого введена метильная группа, не способен выполнять каталитическую функцию. Способность же взаимодействовать с апопируватдекарбоксилазой сохраняется, причем только с половиной всех имеющихся активных центров фермента. Остальные участки связывания тиаминпирофосфата остаются свободными и не способны взаимодействовать с аналогом [433].

Пируватдекарбоксилаза из *Zymomonas mobilis* и ацетолактатсинтетазы из *Aerobacter aerogenes* теряет часть кофермента при однократном пропускании их через сефадекс. Оставшееся его количество прочно связано с белком и не отделяется от него даже при повторных пропусканиях через сефадекс [361].

В нативной холотранскетолазе определено содержание кальция в количестве 2 г·атом на моль фермента [285]. Других двухвалентных катионов практически не обнаруживали. В нативной холопируватдекарбоксилазе, выделенной из пивных дрожжей, найден только магний [179, 180]. Этот же металл, по-видимому, присутствует и в пируватоксидазе, изолированной из *Proteus vulgaris* [493]. О количественном содержании магния ничего не известно, так как в обоих случаях ферментные препараты не были гомогенны.

Приведенными примерами ограничиваются данные о качественном и количественном содержании металлов в тиаминовых ферментах, хотя и показано, что практически все эти ферменты в той или иной степени активируются двухвалентными катионами. Исследования в основном проводили в плане сравнения различных ионов металлов, по их способности повышать величину ферментативной активности. Обычно для этих целей использовали ферменты, лишенные кофакторов, и в систему добавляли тиаминпирофосфат и соответствующие катионы. Общепринятым считается, что металл в тиаминовых ферментах выполняет функцию «мостика» между белком и тиаминпирофосфатом, принимая, таким образом, участие в образовании холофермента.

С транскетолазой пекарских дрожжей установлено, что для образования холофермента из апофермента и тиаминпирофосфата наличие двухвалентных катионов обязательно [32]. Нельзя, однако, исключить возможности взаимодействия тиаминпирофосфата с активными центрами других ферментов и без участия двухвалентных катионов. Специальные исследования в этом плане в металлостерильных условиях с использованием апофермента, полностью лишенного ионов металла, не проводили, но некоторые косвенные данные указывают на такую возможность [250, 361, 377, 392, 478].

Активирующее действие катионов с разными ферментами выражено в неодинаковой степени. Так, для транскетолазы пекарских дрожжей активирующая способность ионов металлов возрастала в следующем ряду: марганец > магний > железо, цинк, никель > кобальт, кальций > кадмий (29), а для пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей этот ряд выглядел таким образом: магний > марганец > кобальт > кадмий > цинк > кальций > > железо (180). В то время как ацетоинсинтетаза из *Streptococcus faecalis* активировалась только магнием, марганцем или кобальтом, другие двухвалентные катионы влияния на каталитические свойства фермента не оказывали [146].

Транскетолаза, выделенная как из пивных, так и из пекарских дрожжей, активируется кальцием, марганцем, магнием и кадмием, хотя по степени активации указанными катионами эти ферменты различаются. Но более существенно в данном случае то, что каталитическая активность первого фермента не изменяется при добавлении в среду ионов цинка [377], а активность второго существенно повышается [29]. Концентрация добавленного металла в обоих случаях была одинакова.

Многие ионы двухвалентных металлов повышают скорость реконструкции холофермента из апофермента и кофермента. Оказалось, что для пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей эффект в присутствии кальция был максимальный [432], а с тем же ферментом, но выделенным из пекарских дрожжей, — минимальный [429].

Существенное влияние оказывает природа катиона на прочность связи тиаминпирофосфата с белком. И в этом смысле различные ферменты ведут себя неодинаково. От холотранскетолазы, реконструированной в присут-

ствии кальция, кофермент не отделяется при гель-фильтрации. Это было показано с транскетолазой, выделенной из пекарских дрожжей [32] и пивных дрожжей [377]. Если при реконструкции вместо кальция в среду был добавлен магний, то при последующем пропускании через сефадекс наблюдалось частичное отщепление тиаминпирофосфата от холофермента, в несколько большей степени выраженное в том случае, когда в опытах использовали транскетолазу пивных дрожжей.

Противоположная картина наблюдалась с пируватдекарбоксилазой пивных дрожжей [443, 445]. Холофермент, реконструированный в присутствии магния, при пропускании через сефадекс сохраняет свою активность, и для ее проявления не требуется добавлять кофакторы извне. Другими словами, тиаминпирофосфат в этих условиях связывается с белком необратимо. Если же реконструкцию проводили в присутствии кальция, то при гель-фильтрации кофермент полностью отщеплялся и переходил в раствор, т. е. связывание тиаминпирофосфата с белком было обратимое.

Данных о влиянии различных катионов на каталитические свойства тиаминовых ферментов в литературе приводится очень много, но не всегда возможно их сопоставить и с уверенностью говорить о природе этого влияния. Причиной является неидентичность условий проведения экспериментов. В то же время компоненты реакционной среды существенно влияют на свойства тиаминовых ферментов, в том числе и на их способность взаимодействовать с тиаминпирофосфатом. Например, в случае транскетолазы природа буфера и наличие в среде субстрата резко изменяют величину  $K_m$  для кофермента, и их действие не проявляется, если исследования проводили в присутствии кальция [21].

Еще более наглядная картина получена с декарбоксилазным компонентом пируватдегидрогеназного комплекса, выделенного из мозга быка. Этот фермент взаимодействовал с тиаминпирофосфатом только в присутствии фосфата. Без него каталитическая активность фермента практически не восстанавливалась совсем, несмотря на наличие в среде высокой концентрации кофакторов [48].

Вообще нужно сказать, что фосфат оказывает на тиаминовые ферменты существенное влияние. Это с оче-

видностью следует уже из только что приведенного примера. Кроме того, в присутствии фосфата резко меняются физико-химические свойства изоформ транскетолазы [30, 277]. Показано его влияние на степень кооперативности при исследовании взаимодействия субстрата (пирувиноградной кислоты) с пируватдекарбоксилазой пивных дрожжей [96].

Взаимодействие тиаминпирофосфата с апотранскетолазой происходит как минимум по трем точкам и осуществляется за счет его тиаминовой части и двух фосфатных остатков [278]. Аналогично, по-видимому, взаимодействует кофермент и с другими тиаминовыми ферментами. Для пируватдекарбоксилазы показано непосредственное участие метильных групп, стоящих соответственно в четвертом положении тиазолового кольца и во втором положении пиримидинового кольца, а также 1'-N-атома во взаимодействии кофермента с апоферментом.

Аминогруппа тиаминпирофосфата, по-видимому, не взаимодействует с молекулой белка, но расположена в непосредственной близости от ее поверхности [433].

С апотранскетолазой взаимодействие кофермента осуществляется при участии положительно заряженного тиазолового кольца тиаминпирофосфата [27, 63, 64]. При этом образуется комплекс с переносом заряда, играющий важную роль в осуществлении ферментом его каталитической функции [214, 279, 281, 284]. Связь транскетолаза — тиаминпирофосфат при образовании комплекса с переносом заряда если и стабилизируется, то очень незначительно. Значительно большего вклада следует, по-видимому, ожидать при взаимодействии с апотранскетолазой пиримидиновой части кофермента [424, 503].

Во всех случаях основную «якорную» функцию выполняет пирофосфатный остаток кофермента [21, 554]. Однако для транскетолазы его роль этим не ограничивается. В результате взаимодействия пирофосфатного остатка тиаминпирофосфата с апотранскетолазой создаются необходимые предпосылки для формирования каталитически активного центра фермента [27, 63].

Возможно, аналогичную функцию пирофосфатный остаток выполняет в процессе взаимодействия тиаминпирофосфата и с другими тиаминовыми ферментами.



В пользу этого говорит то, что тиамин и тиаминмонофосфат способны связываться с апоферментом, однако каталитической функцией не обладают. В то же время известно, что указанные аналоги кофермента в такой же степени, как и сам кофермент, осуществляют превращение субстратов в условиях модельной системы [73, 309, 310, 313, 316, 357, 391].

В состав активного центра транскетолазы входят остатки гистидина и триптофана, участвующие во взаимодействии тиаминпирофосфата с апоферментом [22, 212, 213, 217, 281]. Наличие остатков триптофана предполагается и в активном центре пируватдекарбоксилазы пивных дрожжей [61, 554]. Вхождение в состав активного центра остатков гистидина и их участие в связывании кофермента с белком показаны и для декарбоксилазного компонента пируватдегидрогеназного комплекса, выделенного из грудной мышцы голубя [54, 67].

На том основании, что фенилглиоксаль ингибирует транскетолазу и снижает степень реконструкции холофермента из апотранскетолазы и тиаминпирофосфата [424], авторы приходят к заключению, что наряду с остатками гистидина и триптофана в связывании кофермента с белком может принимать участие остаток (или остатки) аргинина.

Все тиаминовые ферменты, по крайней мере те, которые исследованы к настоящему времени, содержат в своем составе сульфгидрильные группы [25, 65, 78, 209, 213, 242, 294, 363, 464, 478, 557]. В количественном содержании сульфгидрильных групп наблюдаются существенные различия. Их относительно мало, например, в транскетолазе пекарских дрожжей [25, 213] и пируватдекарбоксилазе пивных дрожжей [99, 517], но много (до 30 на молекулу фермента) в пируватдекарбоксилазном компоненте пируватдегидрогеназных комплексов, выделенных из грудной мышцы голубя [65] и сердечной мышцы свиньи [294].

В исследованиях с пируватдекарбоксилазой показано, что сульфгидрильные группы данного фермента необходимы для связывания субстрата — пировиноградной кислоты [439], но не участвуют в связывании тиаминпирофосфата [99]. Предохранение ферментов тиаминпирофосфатом от ингибирующего действия на них сульфгидрильных реагентов и снижение числа титруемых

групп при наличии в среде кофермента [65] объясняется скорее общей стабилизацией белковой молекулы, чем непосредственным взаимодействием тиаминпирофосфата с ее сульфгидрильными группами.

Стабилизирующая функция тиаминпирофосфата показана со многими тиаминовыми ферментами при самых разнообразных внешних воздействиях на них: при тепловой денатурации [2, 78, 268], кислотной инактивации [2], действии сульфгидрильных реагентов [65], протеолитических ферментов [216]. Третичная структура при взаимодействии белковой молекулы с коферментом, очевидно, существенно не меняется. По крайней мере различий в содержании упорядоченных структур в апо- и холоферменте, при использовании доступных в настоящее время методов исследования, обнаружено не было [2, 211, 255, 294, 518].

Стабилизирующий эффект тиаминпирофосфата можно объяснить с точки зрения конформационной лабильности белковой молекулы (подробнее об этом см. стр. 96). Но это не единственная возможность. Для тиаминовых ферментов причина может заключаться также и в сохранении их четвертичной структуры. Как уже отмечалось выше, мономерная форма тиаминовых ферментов значительно более лабильна, чем димерная. В то же время кофермент способствует ассоциации мономеров в димер. Поэтому другая причина стабилизации тиаминовых ферментов тиаминпирофосфатом может заключаться в том, что в его присутствии увеличивается доля фермента, находящегося в более стабильной, димерной форме.

О содержании упорядоченных структур в молекуле тиаминовых ферментов сведения ограничены. Содержание  $\alpha$ -спиральной конформации в декарбоксилазном компоненте пируватдегидрогеназного комплекса сердечной мышцы свиньи, транскетолазе пекарских дрожжей и пируватдекарбоксилазе пивных дрожжей составляет соответственно 17% [294], 20% [283] и 25% [518]. Величины, как видим, достаточно близкие. Однако по причинам, о которых уже говорилось выше (стр. 59), к оценке абсолютных значений, характеризующих содержание отдельных упорядоченных структур в молекуле белка, нужно подходить осторожно.

Интересно заметить, что в транскетолазе найдено

относительно высокое содержание  $\beta$ -структур [283], в то время как в пируватдекарбоксилазе они не обнаружены совсем [518]. И еще одно существенное различие двух этих ферментов. В транскетолазе, если судить по аминокислотному составу и определению сульфгидрильных групп в молекуле фермента, имеется шесть дисульфидных связей [25]. Их наличие подтверждают и другие экспериментальные данные. В то же время в пируватдекарбоксилазе дисульфидные связи отсутствуют [518].

Активный центр пируватдекарбоксилазы носит гидрофобный характер. Это показано с использованием тиохромпирофосфата — неактивного аналога тиаминпирофосфата, способного конкурировать с коферментом за активный центр пируватдекарбоксилазы. Данный аналог обладает собственной флуоресценцией. При его взаимодействии с апоферментом происходили характерные изменения в спектре флуоресценции. Они были аналогичны тем изменениям, которые наблюдались в модельной системе, когда тиохромпирофосфат помещали в среду с низкой диэлектрической постоянной (см. главу VII).

Гидрофобная природа активного центра пируватдекарбоксилазы была подтверждена и в опытах с 2-*n*-толуидинонафталин-6-сульфоновой кислотой, которая связывается в основном только с гидрофобными участками белковой молекулы, что сопровождается значительным увеличением интенсивности флуоресценции данного индикатора (см. главу VIII).

Ничего подобного не было получено с транскетолазой, когда были использованы указанные подходы для исследования ее активного центра. Тиохромпирофосфат хотя и конкурировал с тиаминпирофосфатом за активный центр фермента, но тем не менее при взаимодействии аналога с апотранскетолазой никаких изменений в спектре флуоресценции не обнаружено. Не менялась и флуоресценция 2-*n*-толуидинонафталин-6-сульфоновой кислоты (а также 1-анилино-8-нафталинсульфоната — другого флуоресцентного индикатора) при ее добавлении к апотранскетолазе [216].

Таким образом, природа активных центров пируватдекарбоксилазы и транскетолазы существенно различается. Это находит свое выражение и в поведении аналогов тиаминпирофосфата при их взаимодействии с двумя указанными ферментами. В соответствии с гидрофобной

природой активного центра пируватдекарбоксилазы определенный вклад во взаимодействие кофермента с апоферментом вносит 2'-метильная группа тиаминпирофосфата. Замена метильной группы на этильную дает аналог, константа сродства которого к апопируватдекарбоксилазе даже несколько выше, чем для пассивного кофермента [555]. Для транскетолазы величина константы сродства того же самого аналога к апоферменту в пять с лишним раз меньше по сравнению с величиной для тиаминпирофосфата [216].

Окситиаминпирофосфат, неактивный аналог кофермента, у которого аминокгруппа заменена на гидроксильную, взаимодействует с апопируватдекарбоксилазой так же, как и тиаминпирофосфат [555]. Более того, он достаточно легко вытесняется коферментом из его связи с белком, и полное замещение аналога на тиаминпирофосфат осуществляется намного быстрее, чем взаимодействие кофермента со свободной, не связанной с окситиаминпирофосфатом, апопируватдекарбоксилазой [433]. В то же время сродство окситиаминпирофосфата к апотранскетолазе значительно выше, чем тиаминпирофосфата [216], и его вытеснение из связи с белком осуществляется крайне медленно и происходит далеко не полностью даже при использовании высокой концентрации кофермента [134].

И, наконец, при взаимодействии тиаминпирофосфата с апотранскетолазой образуется комплекс с переносом заряда, что находит отражение в соответствующих изменениях спектра поглощения и циркулярного дихроизма [281, 282]. Этого не наблюдалось при исследовании взаимодействия кофермента с апопируватдекарбоксилазой [518].

Таким образом, свойства отдельных представителей тиаминовых ферментов имеют много общего. Это, в основном, касается их субъединичной структуры, условий отщепления кофакторов от холофермента, способности активироваться ионами двухвалентных металлов, «якорной» функции пирофосфатного остатка тиаминпирофосфата и некоторых других свойств. Имеются, однако, и существенные различия. Особенно наглядно они выявляются при исследовании тонкой структуры активного центра.

Взаимодействовать с глицеральдегидфосфатдегидрогеназой с образованием функционального комплекса способна только одна из изоформ транскетолазы — изоформа I [30]. Существование функционального комплекса транскетолаза — трансальдолаза [272] делает возможным предположение о том, что в данном случае во взаимодействии участвует другая изоформа транскетолазы — изоформа II. Таким образом, эта изоформа транскетолазы участвовала бы в функционировании пентозного пути превращения углеводов, а изоформа I обеспечивала бы «переключение» (или взаимосвязь) пентозного пути на гликолитический путь.

До самого последнего времени было принято противопоставлять гликолитический и пентозный пути превращения углеводов. Последний, в противоположность гликолизу, одно время даже назывался «прямой окислительный путь» превращения углеводов. Настало, по-видимому, время пересмотреть такую точку зрения. Наглядным тому подтверждением является наличие комплекса между транскетолазой — типичным ферментом пентозного пути превращения углеводов — и глицеральдегидфосфатдегидрогеназой — типичным ферментом гликолиза. Это подтверждают также данные, недавно полученные С. Е. Севериным и сотр. [465] о центральной роли эритрозо-4-фосфата (образующегося только за счет функционирования пентозного пути) в регуляции обоих путей превращения углеводов — и пентозного, и гликолитического.

Примечательно в этом смысле высказывание С. Е. Северина о том, что «...нельзя признать невозможным объединение в один суммарный процесс анаэробную фазу пентозного пути превращения углеводов и гликолиз» [51].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Анфинсен Х. Б. Труды V МБК, Симпозиум IV. М., Изд-во АН СССР, 1962, с. 93—107.
2. Беляева Р. Х., Черняк В. Я., Магретова Н. Н., Кочетов Г. А. Биохимия, 1978, 43, 545—554.
3. Венкстерн Т. В. Биохимия, 1953, 18, 97—108.
4. Волькенштейн М. В. Физика ферментов. М., «Наука», 1967.
5. Волькенштейн М. В., Фишман С. К. Биофизика, 1966, 11, 956.
6. Гвоздев В. А., Герасимова Т. И., Кочан Г. Л., Браславская О. Ю. Докл. АН СССР, 1976, 227, 1476—1479.
7. Глемжа А. А., Зильбер Л. С. Вопросы мед. химии, 1966, 12, 217—218.
8. Глемжа А. А., Зильбер Л. С., Северин С. Е. Биохимия, 1966, 31, 1033—1040.
9. Гомазкова В. С. Биохимия, 1966, 31, 1142—1149.
10. Гомазкова В. С., Северин С. Е. Биохимия, 1972, 37, 637—647.
11. Дэгли С., Никольсон Д. Метаболические пути. М., 1973, «Мир».
12. Каразе А. М., Колотилова А. И. Биохимия, 1973, 38, 515—519.
13. Косоввер Е. М. Мол. биохимия. М., «Мир», 1964.
14. Кочетов Г. А. Успехи биол. химии, 1958, 3, 243—273.
15. Кочетов Г. А. Успехи соврем. биол., 1966, 161, 17—31.
16. Кочетов Г. А. В сб.: Структура и функция ферментов, вып. 1. Изд. МГУ, 1972, с. 83—149.
17. Кочетов Г. А., Беляева Р. Х. Биохимия, 1972, 37, 233—235.
18. Кочетов Г. А., Изотова А. Е. Биохимия, 1970, 35, 1023—1027.
19. Кочетов Г. А., Изотова А. Е. Докл. АН СССР, 1972, 205, 986.
20. Кочетов Г. А., Изотова А. Е. Биохимия, 1973, 38, 552—559.
21. Кочетов Г. А., Изотова А. Е. Биохимия, 1973, 38, 954—958.
22. Кочетов Г. А., Кобылянская К. Р. Биохимия, 1970, 35, 3—11.
23. Кочетов Г. А., Кобылянская К. Р. Вопросы мед. химии, 1970, 16, 603—606.
24. Кочетов Г. А., Кобылянская К. Р. Бюллетень эксперим. биол. мед., 1971, 8, 55—57.
25. Кочетов Г. А., Кобылянская К. Р., Белянова Л. П. Биохимия, 1973, 38, 1303—1304.
26. Кочетов Г. А., Усманов Р. А. Биохимия, 1970, 35, 611—621.
27. Кочетов Г. А., Усманов Р. А. Докл. АН СССР, 1972, 202, 471.
28. Кочетов Г. А., Филиппов П. П. Докл. АН СССР, 1970, 191, 234.
29. Кочетов Г. А., Филиппов П. П., Усманов Р. А. Биохимия, 1969, 34, 810—812.
30. Кочетов Г. А., Чернов Н. Н. Биохимия, 1971, 36, 1168—1174.
31. Крампитц Л. О., Судзуки И., Грейл Г. Труды V МБК. Симпозиум IV. М., Изд-во АН СССР, 1962, с. 343—353.
32. Мешалкина Л. Е., Филиппов П. П., Кочетов Г. А. Биохимия, (в печати).
33. Мильман Л. С., Юровицкий Ю. Г. Биохимия, 1969, 34, 376—379.
34. Мосолов Н. Н., Степура И. И., Островский Ю. М. Биохимия, 1972, 37, 1265—1275.
35. Островский Ю. М. Укр. биохим. журн., 1959, 31, 617—633.
36. Островский Ю. М. Биохимия, 1967, 32, 80—87.
37. Островский Ю. М. Биохимия, 1967, 32, 933—942.
38. Островский Ю. М. Вопросы мед. химии, 1968, 14, 61—67.

39. *Островский Ю. М.* Тиамин. Минск, «Беларусь», 1971.
40. Механизм межвитаминовых взаимоотношений. Под редакцией Ю. М. Островского. Минск, «Наука и техника», 1973.
41. Кокарбоксилаза. Под редакцией Ю. М. Островского. Минск, «Наука и техника», 1974.
42. *Островский Ю. М.* Активные центры и группировки в молекуле тиамина. Минск, «Наука и техника», 1975.
43. *Островский Ю. М., Доста Г. А., Садовник М. Н., Мосолов Н. Н., Ясников А. А., Шелленбергер А., Хюбнер Г., Киши Х.* Биохимия, 1970, 35, 922—931.
44. *Островский Ю. М., Лукашин Н. К., Доста Г. А., Требухина Р. В., и др., Cor et vasa*, 1969, 11, 250—266.
45. *Островский Ю. М., Степура И. И., Шелленбергер А., Хюбнер Х.* Биохимия, 1971, 36, 1222—1227.
46. *Островский Ю. М., Ульрих И., Хольцер Х.* Биохимия, 1976, 36, 739—746.
47. *Птицин О. Б.* Успехи соврем. биол., 1967, 63, 3—27.
48. *Решеляускайте В. Л., Антипова И. В., Глемжа А. А.* Биохимия, 1972, 37, 1296—1301.
49. *Северин С. Е., Гомазкова В. С.* Биохимия, 1971, 36, 1099—1106.
50. *Северин С. Е., Гомазкова В. С., Красовская О. Э.* Докл. АН СССР, 1974, 218, 719—721.
51. *Северин С. Е., Степанова Н. Г.* Изв. АН СССР, 1974, серия биол., № 3, 416—424.
52. *Северин С. Е., Хайлова Л. С., Бернхард Р.* Биохимия, 1976, 41, 1391—1396.
53. *Северин С. Е., Хайлова Л. С., Бернхардт Р.* Укр. биохим. журн., 1976, 48, 503—509.
54. *Северин С. Е., Хайлова Л. С., Кереева Д. Н.* Укр. биохим. журн., 1976, 48, 510—516.
55. *Северин С. Е., Шестаков С. В.* Биохимия, 1961, 140, 1452—1455.
56. *Северин С. Е., Шестаков С. В., Воробьев О. Е.* Докл. АН СССР, 1961, 138, 462—465.
57. *Сент-Дьердьи А.* Введение в субмолекулярную биологию. М., «Наука», 1964.
58. *Снечкуте М. А., Глемжа А. А.* Биохимия, 1976, 41, 491—495.
59. *Снечкуте М. А., Сучилене С. П., Глемжа А. А.* Укр. биохим. журн., 1976, 48, 195—199.
60. *Степура И. И.* Автореферат канд. диссертации. Минск, 1975.
61. *Степура И. И., Островский Ю. М.* Биоорг. химия, 1975, 1, 821—827.
62. *Труфанов А. В.* Биохимия и физиология витаминов и антивитаминов, 1959. М.
63. *Усманов Р. А., Қочетов Г. А.* Сборник трудов научной конференции Межфакультетской лаборатории биоорганической химии МГУ. Изд-во МГУ, 1971, с. 239—246.
64. *Усманов Р. А., Қочетов Г. А.* Материалы I Всес. симпозиума: «Биохимия синтеза и обмена коферментов и коферментных витаминов». Киев, «Наукова думка», 1972, с. 32—34.
65. *Хайлова Л. С.* Биохимия, 1971, 36, 143—151.
66. *Хайлова Л. С., Глемжа А. А., Северин С. Е.* Биохимия, 1970, 35, 536—542.
67. *Хайлова Л. С., Кереева Д. Н., Северин С. Е.* Укр. биохим. журн., 1972, 44, 718—723.

68. Хайлова Л. С., Москалева Е. Ю. Биохимия, 1970, **193**, 944—947.
69. Хайлова Л. С., Фейгина М. М., Георгиу С., Северин С. Е. Биохимия, 1972, **37**, 1312—1314.
70. Чернов Н. Н. Вестник МГУ, 1970, № 6, 128—129.
71. Черняк В. Я., Беляева Р. Х., Магретова Н. Н., Кочетов Г. А. Биохимия, 1977, **42**, 159—161.
72. Штрауб Ф. Б., Собольчи Г. В сб.: Молекулярная биология. Проблемы и перспективы. М., «Наука», 1964, с. 182—187.
73. Юркевич А. М. Успехи химии, 1964, **33**, 418—448.
74. Albert A. Biochem. J., 1952, **50**, 690—698.
75. Altermatt H. A., Simpson F. J., Neish A. C. Canad. J. Microbiol., 1955, **1**, 473—478.
76. Anfinsen C. B., Haber E. J. Biol. Chem., 1961, **236**, 1361—1363.
77. Anfinsen C. B., Sela M., Cooke J. P. J. Biol. Chem., 1962, **237**, 1825—1831.
78. Asakawa T., Wada H., Jamano T. Biochim. et biophys. acta, 1968, **170**, 375—391.
79. Auhagen E. Z. physiol. Chem., 1932, **204**, 149—167.
80. Auhagen E. Z. physiol. Chem., 1932, **209**, 20—26.
81. Axelrod B., Bandurski R. S., Greiner C. M., Jang R. J. Biol. Chem., 1953, **202**, 619—634.
82. Badour S. S., Waygood E. R. Biochim. et biophys. acta, 1971, **242**, 493—499.
83. Barnard E. A., Stein W. D. Adv. Enzymol., 1958, **20**, 51—110.
84. Barrera C. R., Namihira G., Hamilton L., Munk P., Eley M. H., Linn T. C., Reed L. J. Arch. Biochem. and Biophys., 1972, **148**, 343—358.
85. Barron E. S. G., Singer T. P. J. Biol. Chem., 1945, **157**, 221—240.
86. Bauerle R. H., Freundlich M., Stormer F. C., Umbarger H. E. Biochim. et biophys. acta, 1964, **92**, 142—149.
87. Bellin J. S., Jankus C. A. Arch. Biochem. and Biophys., 1968, **123**, 18.
88. Benett R., Fuller R. C. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964, **16**, 300—307.
89. Bergel F., Todd A. R. J. Chem. Soc., 1937, 1504—1509.
90. Bernstein J. A. J. Biol. Chem., 1953, **205**, 317—329.
91. Beychok S. In: Poly- $\alpha$ -Amino Acids. G. D. Fasman (Ed.). N. Y., Acad. Press, 1967, p. 293—337.
92. Biaglow J. E., Mienyal J. J., Suchy J., Sable H. Z. J. Biol. Chem., 1969, **244**, 4054—4062.
93. Bishop J. S., Larner J. Biochim. et biophys. acta, 1969, **171**, 374.
94. Bock K. W., Jaenicke L., Holzer H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1962, **9**, 472—476.
95. Bogucka K., Wojtczak L. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1971, **44**, 1330—1337.
96. Boiteux A., Hess B. FEBS Lett., 1970, **9**, 293—296.
97. Bolotina J. A., Marcovich D. S., Volkenstein M. B., Zavodsky P. Biochim. et biophys. acta, 1967, **132**, 260—270.
98. Bonsignore A., Pontremoli S., Mangiarotti G., De Flora A., Mangiarotti M. J. Biol. Chem., 1962, **237**, 3597—3602.
99. Brauner T., Ullrich J. Z. physiol. Chem., 1972, **353**, 825—831.
100. Brdiczka D., Pette D., Brunner G., Miller F. Europ. J. Biochem., 1968, **5**, 294—304.



101. *Bremer J.* Biochim. et biophys. acta, 1966, **116**, 1—11.
102. *Bremer J.* Europ. J. Biochem., 1969, **8**, 535—540.
103. *Breslow R. J.* Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 1762—1763.
104. *Breslow R.* Chem. and Ind., 1957a, 893—894.
105. *Breslow R. J.* Amer. Chem. Soc., 1958, **80**, 3719—3726.
106. *Breslow R., McNelis E. J.* Amer. Chem. Soc., 1959, **81**, 3080—3082.
107. *Bresters T. W., De Abreu R. A., De Kok A., Visser J., Veeger C.* Europ. J. Biochem., 1975, **59**, 335—345.
108. *Bresters T. W., De Kok A., Veeger C.* Europ. J. Biochem., 1975, **59**, 347—353.
109. *Brewer J. M., Weber G. J.* Biol. Chem., 1966, **241**, 2550—2557.
110. *Bruice T. A., Benkovic S. J.* Bioorganic mechanism, v. 2, chap. 8. N. Y., Benjamin Inc., 1966.
111. *Brunings K. J. J.* Amer. Chem. Soc., 1947, **69**, 205—208.
112. *Bryce C. F. A., Williams D. C., John R. A.* Biochem. J., 1976, **153**, 571—577.
113. *Burton K.* Biochem. J., 1959, **71**, 388—395.
114. *Cajori F. A. J.* Biol. Chem., 1942, **143**, 357—361.
115. *Carlson G. L., Brown G. M. J.* Biol. Chem., 1960, **235**, PC3—PC4.
116. *Carlson G. L., Brown G. M. J.* Biol. Chem., 1961, **236**, 247—256.
117. *Caroline D. F., Harding R. W., Kuwana H., Satyanwrayana T., Wagner R. P.* Genetics, 1969, **62**, 487—494.
118. *Carson S. F., Ruben S., Kamen M. D., Foster J. W.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1941, **27**, 475—480.
119. *Cavalieri S. W., Neet K. E., Soble H. Z.* Arch. Biochem. and Biophys., 1975, **171**, 527—532.
120. *Cavalieri R. L., Sable H. Z.* Fed. Proc., 1972, **31**, 3568.
121. *Chakravorty A., Cotton F. A. J.* Phys. Chem., 1963, **67**, 2878—2879.
122. *Chatterjee G. C., Noltman E. A.* Europ. J. Biochem., 1967, **2**, 9—18.
123. *Cifirri O.* Enzymologia, 1962, **24**, 283—297.
124. *Cilento G., Giusti P. J.* Amer. Chem. Soc., 1959, **81**, 3801—3802.
125. *Cook R. A., Koshland D. E.* Biochemistry, 1970, **9**, 3337—3342.
126. *Cooper J., Srere P. A., Tabachnick M., Racker E.* Arch. Biochem. and Biophys., 1958, **74**, 306—314.
127. *Coore H. G., Field B.* Biochem. J., 1974, **142**, 87—95.
128. *Coore H. G., Denton R. M., Martin B. R., Randle P. J.* Biochem. J., 1971, **125**, 115—127.
129. *Corbin J. D., Krebs E. G.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1969, **36**, 328—336.
130. *Crosby J., Lienhard G. E. J.* Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 5706.
131. *Crosby J., Stone R., Lienhard G. E. J.* Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 2891—2900.
132. *Das M. L., Koike M., Reed L. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1961, **47**, 753—759.
133. *Datta A. G., Racker E.* Arch. Biochem. and Biophys., 1959, **82**, 489—490.
134. *Datta A. G., Racker E. J.* Biol. Chem., 1961, **236**, 617—623.
135. *Datta A. G., Racker E. J.* Biol. Chem., 1961, **236**, 624—628.
136. *Davies D. D. J.* Mol. Biol., 1964, **9**, 605—609.
137. *Davies D. D.* Biochem. J., 1967, **104**, 50 p.
138. *Davies D. D., Kenworthy P.* Phytochemistry, 1969, **8**, 1887—1895.
139. *Davies D. D., Kenworthy P. J.* Exper. Bot., 1970, **21**, 247—257.
140. *Delien T., Walker D. A.* Analyt. Biochem., 1966, **16**, 160—166.

141. *De Lorenzo F., Goldberger R. F., Steers E., Givol D., Anfinsen C. B.* J. Biol. Chem., 1966, **241**, 1562—1567.
142. *Dennert G., Eaker D.* FEBS Lett., 1970, **6**, 257—261.
143. *Dennert G., Höglund S.* Europ. J. Biochem., 1970, **12**, 502—507.
144. *Denton R. M., Randle R. J.* Abstrs IX Internat. Congr. Biochem Stockholm, 1973, p. 351.
145. *Desai J. E., Polglase W. J.* Biochim. et biophys. acta, 1965, **110**, 181—188.
146. *Dolin M. J., Gunsalus I. C.* J. Bacteriol., 1951, **62**, 199—214.
147. *Duee E. D., Vignais P. V.* J. Biol. Chem., 1969, **244**, 3920—3931.
148. *Edelman G. M., Mc Clure W. O.* Accounts Chem. Res., 1968, **1**, 65.
149. *Eich S., Cerecedo L. R.* J. Biol. Chem., 1954, **207**, 295—303.
150. *Eley M. H., Nanihira G., Hamilton L., Munk P., Reed L. J.* Arch. Biochem. and Biophys., 1972, **152**, 655—669.
151. *Epstein C. J., Goldberger R. F.* J. Biol. Chem., 1963, **238**, 1380.
152. *Eusebi A. J., Cerecedo L. R.* Fed. Proc., 1950, **9**, 169.
153. *Fahien L., Smith S. J.* J. Biol. Chem., 1974, **249**, 2696—2703.
154. *Fernandez-Moran H., Reed L. J., Koike M., Willms C. R.* Science, 1964, **145**, 930—932.
155. *Fonseca-Wollheim F., Bock K. W., Holzer H.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1962, **9**, 466—471.
156. *Fonseca-Wollheim F., Heesen H., Holzer H.* Biochem. Z., 1964, **340**, 383—389.
157. *Freude K. A.* Biochim. et biophys. acta, 1968, **167**, 485—488.
158. *Frey P. A., Maldonado M. E., Oh K. J.* Fed. Proc., 1972, **31**, 1615.
159. *Friedrich P., Polgar L., Szabolesi G.* Acta physiol. Acad. scient. Hung., 1964, **25**, 217—228.
160. *Friedrich P., Polgar L., Szabolesi G.* Nature, 1964, **202**, 1214.
161. *Fry K., Ingraham L. L., Westheimer F. H.* J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 5225—5227.
162. *Fuchs S., De Lorenzo F., Anfinsen C. B.* J. Biol. Chem., 1967, **242**, 398—402.
163. *Gallo A. A., Hansen I. L., Sable H. Z., Swift I. J.* J. Biol. Chem., 1972, **247**, 5913—5920.
164. *Gallo G. G., Pasqualucci C. R., Radacelli P. A., Lancini G. C.* J. Org. Chem., 1964, **29**, 862—865.
165. *Garland P. B., Newsholme E. A., Randle P. J.* Nature, 1962, **195**, 381—383.
166. *Garland P. B., Randle P. J.* Biochem. J., 1964, **91**, 6c—7c.
167. *Ginsburg A., Appel P., Schachman H. K.* Arch. Biochem. and Biophys., 1956, **65**, 545—566.
168. *Givol D., Goldberger R. F., Anfinsen C. B.* J. Biol. Chem., 1964, **239**, PC3114—PC3116.
169. *Glad B. W., Spikes J. D.* Radiat. Res., 1966, **27**, 237—249.
170. *Glatzer L., Eakin E., Wagner R. P.* J. Bacteriol., 1972, **112**, 453—464.
171. *Goedde H. W.* Internat. Z. Vitaminforsch., 1963, **33**, 18—40.
172. *Goedde H. W., Inouge H. U., Holzer H.* Biochim. et biophys. acta, 1961, **50**, 41—44.
173. *Goedde H. W., Ullrich B., Stahlmann C., Holzer H.* Biochem. Z., 1965, **343**, 204—210.
174. *Goldberg M. L., Racker E.* J. Biol. Chem., 1962, **237**, 3841—3842.
175. *Goldberger R. F., Epstein C. J., Anfinsen C. B.* J. Biol. Chem., 1964, **239**, 1406—1410.
176. *Goldman D. S.* Biochim. et biophys. acta, 1958, **27**, 513—518.

177. Gounaris A. D., Furkenkopf I., Buckwald S., Young A. J. Biol. Chem., 1971, **246**, 1302—1309.
178. Grande H. J., Bresters T. W., De Abreu R. A., De Kok A., Vee-ger C. Europ. J. Biochem., 1975, **59**, 355—363.
179. Green D. E., Herbert D., Subrahmanyam V. J. Biol. Chem., 1940, **135**, 795—796.
180. Green D. E., Herbert D., Subrahmanyam V. J. Biol. Chem., 1941, **138**, 327—339.
181. Green D., Stumpf P., Zarudnaja K. J. Biol. Chem., 1947, **167**, 811—816.
182. Green D. E., Westerfeld W. W., Vennesland B., Knox W. E. J. Biol. Chem., 1942, **145**, 69—85.
183. Greenfield N., Davidson B., Fasman G. Biochemistry, 1967, **6**, 1630—1637.
184. Greenfield N., Fasman G. D. Biochemistry, 1969, **8**, 4108—4116.
185. Gubler C. J. J. Biol. Chem., 1961, **236**, 3112—3120.
186. Gubler C. J. Internat. Z. Vitaminforsch., 1968, **38**, 287—303.
187. Guder W. G., Wieland O. H. Europ. J. Biochem., 1974, **42**, 529—538.
188. Gunsalus I. C. Fed. Proc., 1954, **13**, 715—722.
189. Gunsalus I. C. In: Symposium on the Mechanism of Enzyme Action. W. D. McElroy and B. Glass. (Eds). Baltimore. John Hopkins Press, 1954, p. 545—580.
190. Gunsalus J. C., Gunsalus C. F., Stanier R. J. J. Bacteriol., 1953, **66**, 538—542.
191. Günther T. Z. Naturforsch., 1969, **24b**, 428—432.
192. Guthöhrlein G., Knappe I. Europ. J. Biochem., 1968, **7**, 119—127.
193. Haba G., Leder I. G., Racker E. J. Biol. Chem., 1955, **214**, 409.
194. Haba G., Racker E. Fed. Proc., 1952, **11**, 201.
195. Haber E., Anfinsen C. B. J. Biol. Chem., 1961, **236**, 422—424.
196. Hager L. P., Geller D. M., Lipmann F. Fed. Proc., 1954, **13**, 734—738.
197. Hall D. O., Greenawalt J. W. J. Gen. Microbiol., 1967, **48**, 419.
198. Hall R. L., Kezdy F. J. Arch. Biochem. and Biophys., 1970, **138**, 551—556.
199. Halpern Y. S., Umbarger H. E. J. Biol. Chem., 1959, **234**, 3067.
200. Hansen R. G., Henning U. Biochim. et biophys. acta, 1966, **122**, 355—358.
201. Harding R. W., Caroline D. F., Wagner R. P. Arch. Biochem. and Biophys., 1970, **138**, 653—661.
202. Harrison S. C., Blout E. R. J. Biol. Chem., 1965, **240**, 299—303.
203. Havsteen B. H. J. Theor. Biol., 1966, **10**, 1—10.
204. Hayakawa T., Hirashima M., Ide S., Hamada M., Okabe K., Koike M. J. Biol. Chem., 1966, **241**, 4694—4699.
205. Hayakawa T., Hirashima M., Hamada M., Koike M. Biochim. et biophys. acta, 1966, **128**, 574—576.
206. Hayakawa T., Kanzaki T., Kitamura T., Fukuyoshi Y., Sakurai Y., Koike K., Suematsu T., Koike M. J. Biol. Chem., 1969, **244**, 3660.
207. Hayakawa T., Koike M. J. Biol. Chem., 1967, **242**, 1356—1359.
208. Hayakawa T., Muta H., Hirashima M., Ide S., Okabe K., Koike M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964, **17**, 51—56.
209. Heath E. C., Hurwitz J., Horecker B. L., Ginsburg A. J. Biol. Chem., 1958, **231**, 1009—1029.
210. Heinrich C. P. Experientia, 1973, **29**, 1227—1228.

211. *Heinrich C. P., Liske R., Reber K.* Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 1974, **355**, 217—221.
212. *Heinrich C. P., Noack K., Wiss O.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1971, **44**, 275—279.
213. *Heinrich C. P., Noack K., Wiss O.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1972, **49**, 1427—1432.
214. *Heinrich C. P., Schmidt D.* Experientia, 1973, **29**, 1226—1227.
215. *Heinrich C. P., Schmidt D., Noack K.* Europ. J. Biochem., 1974, **41**, 555—561.
216. *Heinrich C. P., Steffen H., Janser P., Wiss O.* Europ. J. Biochem., 1972, **30**, 533—541.
217. *Heinrich C. P., Wiss O.* Abstrs, VII Meeting FEBS, 1971, p. 106.
218. *Heinrich C. P., Wiss O.* Helv. chim. acta, 1971, **54**, 2658—2668.
219. *Heinrich C. P., Wiss O.* FEBS Lett., 1971, **14**, 251—253.
220. *Henning U.* Abstrs VIIIth Internat. Congr. Biochem., Switzerland, 1970, p. 254—256.
221. *Hermans J., Puett D., Acampora G.* Biochemistry, 1969, **8**, 22—30.
222. *Herrera M. G., Kamm D., Ruderman N., Cahill G. F.* Adv. Enzyme Regulat., 1966, **4**, 225—235.
223. *Hespell R. B., Joseph R., Mortlock R. P.* J. Bacteriol., 1969, **100**, 1328—1334.
224. *Hiatt H. H.* J. Biol. Chem., 1957, **229**, 725—730.
225. *Hirabayashi T., Harada T.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1971, **45**, 1369—1375.
226. *Hirabayashi T., Harada T.* J. Biochem., 1972, **71**, 797—804.
227. *Hirashima M., Hayakawa T., Koike M.* J. Biol. Chem., 1967, **242**, 902—907.
228. *Holzer H.* Angew. Chem., 1961, **73**, 721—727.
229. *Holzer H. U., Beaucamp K.* Angew. Chem., 1959, **71**, 776—776.
230. *Holzer H. U., Beaucamp K.* Biochim. et biophys. acta, 1961, **46**, 225—243.
231. *Holzer H., Fonseca-Wollheim F., Kohlhaas G., Woenckhaus Ch. W.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1962, **98**, 453—465.
232. *Holzer H., Fonseca-Wollheim F., Woenckhaus Ch. W.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1962, **98**, 453—466.
233. *Holzer H., Goedde H. W.* Biochem. Z., 1957, **329**, 192—208.
234. *Holzer H., Goedde H. W., Göggel K.-H., Ullrich B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1960, **3**, 599—602.
235. *Holzer H., Goedde H. W., Ullrich B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1961, **5**, 447—452.
236. *Holzer H., Hierholzer G., Witt I.* Biochem. Z., 1963, **337**, 115.
237. *Holzer H., Kattermann R., Busch D.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1962, **7**, 162—172.
238. *Holzer H., Kohlam G.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1961, **5**, 452—456.
239. *Holzer H., Schröter W.* Biochim. et biophys. acta, 1962, **65**, 271.
240. *Holzer H., Schultz G., Villar-Palasi C., Jünthen-Sell J.* Biochem. Z., 1956, **327**, 331—334.
241. *Horecker B. L.* J. Cell. and Compar. Physiol., 1959, **54**, 89—107.
242. *Horecker B. L.* Methods Enzymol., 1962, **5**, 261—266.
243. *Horecker B. L., Hurwitz J., Smyrniotis P. Z.* J. Amer. Chem. Soc., 1956, **78**, 692—694.
244. *Horecker B. L., Smyrniotis P. Z.* Fed. Proc., 1952, **11**, 232.

245. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z. J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 2123.
246. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z. J. Amer. Chem. Soc., 1953, 20, 1009—1010.
247. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z. Fed. Proc., 1956, 15, 177.
248. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., Hurwitz I. J. Biol. Chem., 1956, 223, 1009—1019.
249. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., Klenow H. Fed. Proc., 1953, 12, 219.
250. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., Klenow H. J. Biol. Chem., 1953, 205, 661—682.
251. Houghton R. L., Swoboda B. E. P. FEBS Lett., 1973, 30, 277.
252. Hübner G., Fischer G., Schellenberger A. Z. Chem., 1970, 10, 436—437.
253. Hübner G., Schellenberger A. Z. physiol. Chem., 1970, 351, 1435.
254. Hübner G., Schellenberger A. Abstrs VII Meeting FEBS, 1971, p. 110.
255. Hübner G., Schellenberger A., Stelmashchuk V. Yu., Kiselev N. A. Acta biol. med. germ., 1975, 34, 699—701.
256. Hübscher G., Mayer R. J., Hansen H. J. M. Bioenergetics, 1971, 2, 115—118.
257. Hurd S. S., Novoa W. B., Hickenbottom J. P., Fischer E. H. Methods Enzymol., 1966, 8, 546—550.
258. Hurwitz J. Biochim. et biophys. acta, 1958, 28, 599—562.
259. Husho F., Randall D. D., Roche T. E., Burgelt M. W., Pelley J. W., Reed L. J. Arch. Biochem. and Biophys., 1972, 151, 328—340.
260. Iatco-Manzo E., Roddy F., Jount R. G., Metzler D. E. J. Biol. Chem., 1959, 234, 733—737.
261. Iugraham L. L., Westheimer F. M. Chem. and Ind., 1956, 846.
262. Ishikawa E., Oliver R. M., Reed L. J. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1966, 56, 534—541.
263. Jagannathan V., Schweet R. S. J. Biol. Chem., 1952, 196, 551.
264. Jagow G., Westermann B., Wieland O. Europ. J. Biochem., 1968, 3, 512—518.
265. Junger E., Reinauer H., Wais U., Ullrich J. Z. physiol. Chem., 1973, 354, 1655—1658.
266. Juni E. J. Biol. Chem., 1961, 236, 2302—2308.
267. Juni E., Heym G. A. J. Biol. Chem., 1956, 218, 365—378.
268. Juni E., Heym G. A. Arch. Biochem. and Biophys., 1968, 127, 79—88.
269. Kanzaki T., Hayakawa T., Hamada M., Fukuyoshi Y., Koike M. J. Biol. Chem., 1969, 244, 1183—1187.
270. Keech D. B., Utter M. F. J. Biol. Chem., 1963, 238, 2609—2614.
271. Khailova L. S., Feigina M. M., Gomazkova V. S., Severin S. E. In: Veb Verlag Volk und Gesundheit. Berlin, v. 18, 1974, p. 135.
272. Kiely M. E., Tan E. L., Wood T. Canad. J. Biochem., 1969, 47, 455—459.
273. Kirschner V. K., Voigt B. Z. physiol. Chem., 1968, 349, 632—644.
274. Knappe J., Bohnert E., Brummer W. Biochim. et biophys. acta, 1965, 107, 603—605.
275. Knappe J., Schacht J., Möckel W. Europ. J. Biochem., 1969, 11, 316—327.
276. Koch J., Stokstad E. L. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1966, 23, 585—591.

277. Kochetov G. A., Chernov N. N. *Experientia*, 1970, 26, 1067.
278. Kochetov G. A., Izotova A. E., Meshalkina L. E. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1971, 43, 1198—1203.
279. Kochetov G. A., Meshalkina L. E., Usmanov R. A. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976, 69, 839—843.
280. Kochetov G. A., Nikitushkina L. I., Chernov N. N. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1970, 40, 873—878.
281. Kochetov G. A., Usmanov R. A. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1970, 41, 1134—1140.
282. Kochetov G. A., Usmanov R. A., Merzlov V. P. *FEBS Lett.*, 1970, 9, 265—266.
283. Kochetov G. A., Usmanov R. A., Merzlov V. P. *FEBS Lett.*, 1971, 14, 14—16.
284. Kochetov G. A., Usmanov P. A., Mevkh A. T. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1973, 54, 1619—1626.
285. Kochetov G. A., Philippov P. P. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1970, 38, 990—993.
286. Kochetov G. A., Philippov P. P. *FEBS Lett.*, 1970, 6, 49—51.
287. Kochetov G. A., Philippov P. P. *Analyt. Biochem.*, 1972, 48, 286—291.
288. Kochetov G. A., Philippov P. P., Tikhomirova N. K. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1975, 63, 924—930.
289. Kochetov G. A., Philippov P. P., Tikhomirova N. K., Razjivin A. P. *FEBS Lett.*, 1975, 53, 211—212.
290. Koffler H., Krampitz L. O. *Bacteriol. Proc.*, 1955, 113—114.
291. Kohlhaw G., Dens B., Holzer H. J. *Biol. Chem.*, 1965, 240, 2135.
292. Koike M. J. *Vitaminol.*, 1968, 14, (suppl.), 86—97.
293. Koike M., Hamada M., Kanzaki T. J. *Vitaminol.*, 1959, 15, 323—324.
294. Koike M., Hamada M., Koike K. *Abstrs VIII Internat. Congr. Biochem.*, Switzerland, 1970, p. 253—254.
295. Koike M., Reed L. J. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1959, 81, 505.
296. Koike M., Reed L. J. J. *Biol. Chem.*, 1960, 235, 1931—1938.
297. Koike M., Reed L. J., Carroll W. R. J. *Biol. Chem.*, 1960, 235, 1924—1930.
298. Koike M., Reed L. J., Carroll W. R. J. *Biol. Chem.*, 1963, 238, 30—39.
299. Kondo H., Ishimoto M. J. *Biochem.*, 1972, 72, 487—489.
300. Kondo H., Ishimoto M. J. *Biochem.*, 1974, 76, 229—231.
301. Kondo H., Ishimoto M. J. *Biochem.*, 1975, 78, 315—317.
302. Kondo H., Kagotani K., Oshima M., Ishimoto M. J. *Biochem.*, 1973, 73, 1269—1278.
303. König T., Szabados G. *Acta biochim. biophys. Acad. Scient. Hung.*, 1967, 2, 253—261.
304. Korkes S. In: *A symposium on Phosphorus Metabolism*, v. 1. W. D. Mc Elroy, B. Glass (Eds). Baltimore, John Hopkins Press, 1951, p. 259—264.
305. Korkes S., Campillo A., Gunsalus I. C., Ochoa S. J. *Biol. Chem.*, 1951, 193, 721—735.
306. Korkes S., Stern J. K., Gunsalus I. C., Ochoa S. *Nature*, 1950, 166, 439—440.
307. Kornberg H. L. *Bull. Soc. chim. biol.*, 1967, 49, 1479—1490.
308. Kornberg H. L., Racher E. *Biochem. J.*, 1955, 61, iii—iv.
309. Krampitz L. O. J. *Vitaminol.*, 1969, 15, 321—322.

310. *Krampitz L. O.* Thiamin Diphosphate and its Functions N. Y., Marcel Dekker. Inc., 1970.
311. *Krampitz L. O., Greull G., Miller C. S., Bicking J. B., Skeggs H. R., Sprague J. M.* J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 5893—5894.
312. *Krampitz L. O., Greull G., Suzuki I.* Fed. Proc., 1959, 18, 266.
313. *Krampitz L. O., Suzuki I., Greull G.* Fed. Proc., 1961, 20, 971.
314. *Krampitz L. O., Suzuki I., Greull G.* Brookhaven Symposia in Biology, 1962, N 15, p. 282—292.
315. *Krampitz L. O., Suzuki I., Greull G.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1962, 98, 466—478.
316. *Krampitz L. O., Votaw R.* Methods Enzymol., 1966, 9, 65—70.
317. *Krebs E. G.* Methods Enzymol., 1955, 1, 407—422.
318. *Krebs H. A.* Proc. Roy. Soc. London, 1964, B159, 545—564.
319. *Kubasik N. R., Richert D. A., Bloom R. I.* Biochemistry, 1972, 11, 2225—2229.
320. *Kuo J. F., Greengard P. J.* Biol. Chem., 1969, 244, 3417—3419.
321. *Kuwana H., Caroline D. F., Harding R. W., Wagner R. P.* Arch. Biochem. and Biophys., 1968, 128, 184—193.
322. *Lamers J. M. J., Hülsmann W. C.* Biochim. et biophys. acta, 1974, 343, 215—225.
323. *Langan T. A.* Science, 1968, 162, 579—580.
324. *Leavitt R. I., Umbarger A. E. J.* Biol. Chem., 1961, 236, 2487—2491.
325. *Lehmann H., Fischer G., Hübner G., Kohnert K. D., Schellenberger A.* Europ. J. Biochem., 1973, 32, 83—87.
326. *Linderstrom-Lang K. U., Schellman J.* The Enzymes, 1959, 1, 443—510.
327. *Linn I. C., Pelley J. W., Pettit F. H., Husho F., Randall D. D., Reed L. J.* Arch. Biochem. and Biophys., 1972, 148, 327—342.
328. *Linn T. C., Pettit F. H., Husho F., Reed L. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1969, 64, 227—234.
329. *Linn T. C., Pettit F. H., Reed L. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1969, 62, 234—241.
330. *Lipmann F.* Nature, 1936, 138, 1097—1098.
331. *Lohmann K., Schuster P.* Biochem. Z., 1937, 294, 188—214.
332. *Lopes-Cardozo M.* Abstrs IX Internat. Congr. Biochem. Stockholm, 1973, p. 352.
333. *Ludewig R., Schellenberger A.* FEBS Lett., 1974, 45, 340—343.
334. *Lumry R., Eyring H. J.* Phys. Chem., 1954, 58, 110—120.
335. *Lusty C. J., Singer T. P. J.* Biol. Chem., 1964, 239, 3733—3742.
336. *Madsen N. B., Shechosky S. J.* Biol. Chem., 1967, 242, 3301—3307.
337. *Magni G., Caulini G., Moret V.* Biochim. et biophys. acta, 1971, 242, 123—128.
338. *Maldonado M. E., Oh K., Frey P. A. J.* Biol. Chem., 1972, 247, 2711—2716.
339. *Malthe-Sobenssen D., Stormer F. C.* Europ. J. Biochem., 1970, 14, 127—132.
340. *Marks P. A., Feigelson P. J.* Biol. Chem., 1957, 226, 1001—1010.
341. *Martin B. R., Clausen T.* Abstrs IX Internat. Congr. Biochem. Stockholm, 1973, p. 376.
342. *Martinez-Carrion M., Turano C., Riva F., Fasella P. J.* Biol. Chem., 1967, 242, 1426—1430.
343. *Massey V.* Biochim. et biophys. acta, 1958, 30, 205—206.
344. *Massey V.* Biochim. et biophys. acta, 1960, 38, 447—460.
345. *Massey V.* The Enzymes, 1963, 7, 275—306.

346. Massey V., Veeger C. *Biochim. et biophys. acta*, 1960, 40, 184—185.
347. Massey V., Veeger C. *Biochim. et biophys. acta*, 1961, 48, 33—47.
348. McClure W. O., Edelman G. M. *Biochemistry*, 1966, 5, 1908—1919.
349. Meisler M. H., Langan T. A. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 4961—4968.
350. Meister A. *J. Biol. Chem.*, 1952, 197, 309—317.
351. Metzler D. E. *The Enzymes*, 1960, 2, 295—337.
352. Mieyal J. J., Bantle G., Votaw R. G., Rosner I. A., Sable H. L. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 5213—5219.
353. Mieyal J. J., Suchy J., Blaglow J. E., Sable H. Z. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 4063—4071.
354. Mieyal J. J., Suchy J., Sable H. Z. *Fed. Proc.*, 1968, 27, 763.
355. Mieyal J. J., Votaw R. G., Krainpitz L. O., Sable H. Z. *Biochim. et biophys. acta*, 1967, 141, 205—208.
356. Mifflin B. J. *Phytochemistry*, 1969, 8, 2271—2276.
357. Miller C. S., Sprague J. M., Krampitz L. O. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, 98, 401—411.
358. Miyamoto E., Kuo J. F., Greengard P. *Science*, 1969, 165, 63—65.
359. Mizuhara S., Handler P. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1954, 76, 571—573.
360. Moffit W., Yang J. T. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1956, 42, 596—603.
361. Morey A. V., Juni E. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 3009—3019.
362. Motai H., Ichishima E., Yoshida F. *Nature*, 1966, 210, 308—309.
363. Moyed H. S., O'Kane D. J. *J. Biol. Chem.*, 1956, 218, 831—840.
364. Mukherjee B. B., Matthews J., Horney D. L., Reed L. J. *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 2268—2269.
365. Mulliken R. S., Person W. B. *Annual Rev. Phys. Chem.*, 1962, 13, 107—126.
366. Murthy V. K., Crevasse L. *Enzymologia*, 1968, 34, 309—316.
367. Nakayama H., Midwinter G. G., Krampitz L. O. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1971, 143, 526—534.
368. Namba Y., Yoshizawa K., Ejima A., Hayashi T., Kaneda T. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 4437—4447.
369. Nawa H., Brady W. T., Koike M., Reed L. J. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1959, 81, 2908—2909.
370. Nawa H., Brady W. T., Koike M., Reed L. J. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1960, 82, 896—903.
371. Neuberg C. *Annual Rev. Biochem.*, 1946, 15, 435—474.
372. Neuberg C., Karezag L. *Biochem. Z.*, 1911, 37, 170—176.
373. Neuberg C., Simon E. *Biochem. Z.*, 1925, 156, 374—378.
374. Nicholls D. G., Shepherd D., Garland P. B. *Biochem. J.*, 1967, 103, 677—691.
375. Oba K., Uritani I. *J. Biochem.*, 1975, 77, 1205—1213.
376. Ostrovsky Yu. M. *J. Vitaminol.*, 1968, 14 (suppl.), 98—102.
377. Ozawa T., Saito S., Tomita I. *Vitamins*, 1971, 44, 308—312.
378. Ozawa T., Saito S., Tomita I. *Vitamins*, 1971, 44, 303—307.
379. Ozawa T., Tomita I., Saito S. *Vitamins*, 1969, 40, 334—339.
380. Palmer G., Massey V. *Biochim. et biophys. acta*, 1962, 58, 349.
381. Parker M. G., Weitzman P. D. *J. Biochem.*, 1973, 135, 215—223.
382. Perham R. N., Thomas J. P. *FEBS Lett.*, 1971, 15, 8—12.
383. Pettit F. H., Roche T. E., Reed L. J. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1972, 49, 563—571.
384. Pilz I., Ullrich J. *Europ. J. Biochem.*, 1973, 34, 256—261.
385. Pletcher J., Sax M. *Science*, 1966, 154, 1331—1333.
386. Pohlandt F., Kohlhaw G., Holzer H. Z. *Naturforsch.*, 1967, 22, 407—412.



387. *Pontremoli S., Bonsignore A., Graxi E., Horecker B. L.* J. Biol. Chem., 1960, **235**, 1881—1887.
388. *Poulsen L., Wedding R. T.* J. Biol. Chem., 1970, **245**, 5709—5717.
389. *Printz M. P., Gounaris A. D.* Fed. Proc., 1972, **31**, 1459.
390. *Prochoroff N. N., Kattermann R., Holzer H.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1962, **9**, 477—481.
391. *Pullman B., Spanjaard C.* Biochim. et biophys. acta, 1961, **46**, 576—587.
392. *Qadri S. M. H., Hoare D. S.* Biochim. et biophys. acta, 1967, **158**, 304—306.
393. *Racker E.* Fed. Proc., 1948, **7**, 180—181.
394. *Racker E.* The Enzymes, 1961, **5**, 397—406.
395. *Racker E.* Methods Enzymol., 1962, **5**, 276—280.
396. *Racker E., Haba G., Leder I. G.* J. Amer. Chem. Soc., 1953, **75**, 1010—1011.
397. *Racker E., Haba G., Leder I. G.* Arch. Biochem. and Biophys., 1954, **48**, 238—240.
398. *Racker E., Krinsky J. J.* J. Biol. Chem., 1952, **198**, 731—743.
399. *Racker E., Schroeder E.* Arch. Biochem. and Biophys., 1957, **66**, 241—251.
400. *Radhakrishnan A. N., Snell E. E.* J. Biol. Chem., 1960, **235**, 2316—2321.
401. *Raeburn S., Rabinowitz J. C.* Arch. Biochem. and Biophys., 1971, **146**, 9—20.
402. *Raeburn S., Rabinowitz J. C.* Arch. Biochem. and Biophys., 1971, **146**, 21—33.
403. *Rall T. W., Sutherland E. W.* Methods Enzymol., 1962, **5**, 377—391.
404. *Ray W. J., Koshland D. E.* J. Biol. Chem., 1961, **236**, 1973—1979.
405. *Ray W. J., Koshland D. E.* J. Biol. Chem., 1962, **237**, 2493—2505.
406. *Reed L. J.* Phys. Rev., 1953, **33**, 544—559.
407. *Reed L. J.* Adv. Enzymol., 1957, **18**, 319—347.
408. *Reed L. J.* The Enzymes, 1960, **3**, 195—223.
409. *Reed L. J.* In: Comprehensive Biochemistry, v. 14. M. Florkin, E. H. Stotz (Eds). Amsterdam, Elsevier, 1966, p. 99—126.
410. *Reed L. J.* In: Current Topics in Cellular Regulation, v. 1. B. I. Horecker, E. R. Stadtman (Eds). N. Y., Acad. Press, 1969, p. 233—251.
411. *Reed L. J.* J. Vitaminol., 1969, **15**, 322.
412. *Reed L. J., Cox D. J.* Annual Rev. Biochem., 1966, **35**, 57—84.
413. *Reed L. J., Cox D. J.* The Enzymes, 1970, **1**, 213—240.
414. *Reed L. J., Koike M.* Fed. Proc., 1961, **20**, 238.
415. *Reed L. J., Leach E. R., Koike M. J.* J. Biol. Chem., 1958, **232**, 123—142.
416. *Reed L. J., Linn T. C., Pettit F. H., Hucho F., Namihira G.* Abstrs VIIIth Internat. Congr. Biochem., Switzerland, 1970, p. 235.
417. *Rippa M., Pontremoli S.* Biochemistry, 1968, **7**, 1514—1518.
418. *Risinger G. E., Dove M. F.* Chem. and Ind., 1965, 510—511.
419. *Roche T. E., Reed L. J.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1972, **48**, 840—846.
420. *Roche T. E., Relley J. W., Randall D. D., Burgett M. W., Reed L. J.* Fed. Proc., 1971, **30**, 1175.
421. *Rosenberg A. J.* J. Biol. Chem., 1966, **241**, 5119—5125.
422. *Sable H. Z., Biaglow J. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1965, **54**, 808—814.

423. *Saito T., Tuboi S., Nishimura Y., Kikuchi G. J. Biochem., 1971, 69, 265—273.*
424. *Saitou S., Ozawa T., Tomita I. FEBS Lett., 1974, 40, 114—118.*
425. *Sakurai Y., Fukuyoshi Y., Hamada M., Hayakawa T., Koike M. J. Biol. Chem., 1970, 245, 4453—4462.*
426. *Sanadi D. R. The Enzymes, 1963, 7, 307—344.*
427. *Sanadi D. R., Langley M., White F. J. Biol. Chem., 1959, 234, 183—187.*
428. *Sanadi D. R., Littlefield J. W., Bock R. M. J. Biol. Chem., 1952, 197, 851—862.*
429. *Sanemori H., Yoshida S., Kawasaki T. J. Biochem., 1974, 75, 123—129.*
430. *Sarcar P. K., Doty P. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1966, 55, 981—989.*
431. *Satyanarayana T., Radhakrishnan A. N. Biochim. et biophys. acta, 1963, 77, 121—132.*
432. *Schellenberger A. Angew. Chem., 1967, 23, 1050—1061.*
433. *Schellenberger A. Wiss. Z. Martin-Luther-Univ., Math.-naturwiss. Reihe, 1969, 18, 319—339.*
434. *Schellenberger A. Absrs VIIIth Internat. Congr. Biochemistry, Switzerland, 1970, p. 119.*
435. *Schellenberger A. Nova acta Leopold., 1971, 36, 9—22.*
436. *Schellenberger A., Heinroth I., Hübner G. Z. physiol. Chem., 1967, 348, 506—511.*
437. *Schellenberger A., Hübner G. Z. physiol. Chem., 1966, 343, 189.*
438. *Schellenberger A., Hübner G. Z. physiol. Chem., 1967, 348, 491.*
439. *Schellenberger A., Hübner G. Angew. Chem., 1968, 80, 41—42.*
440. *Schellenberger A., Hübner G., Lehmann H. Angew. Chem., 1958, 80, 907.*
441. *Schellenberger A., Koble A., Hübner G. Z. physiol. Chem., 1965, 341, 22—26.*
442. *Schellenberger A., Millner R., Hübner G., Otte K.-B. Z. Chem., 1968, 8, 467.*
443. *Schellenberger A., Müller V., Winter K., Hübner G. Z. physiol. Chem., 1966, 344, 244—260.*
444. *Schellenberger A., Rödel W., Rödel H. Z. physiol. Chem., 1964, 339, 123—134.*
445. *Schellenberger A., Thieme H., Hübner G. Z. Chem., 1969, 9, 62.*
446. *Schellenberger A., Wendler K., Creutzburg P., Hübner G. Z. physiol. Chem., 1967, 348, 501—505.*
447. *Schellenberger A., Winter K. Z. physiol. Chem., 1960, 322, 164.*
448. *Schellenberger A., Winter K., Hübner G., Schwaiberger R., Helbig D., Schumacher S., Tieme R., Bouillon G., Rädler K.-P. Z. physiol. Chem., 1966, 346, 123—147.*
449. *Schmidt U., Grafen P., Altland K., Goedde H. W. Adv. Enzymol., 1969, 32, 423—469.*
450. *Schnaitman C., Greenawalt J. W. J. Cell Biol., 1968, 38, 158—175.*
451. *Schramm M., Klybas V., Racker E. J. Biol. Chem., 1958, 233, 1283—1288.*
452. *Schröter W., Holzer M. Biochim. et biophys. acta, 1963, 77, 474—481.*
453. *Schuster L., Goldin A. J. Biol. Chem., 1958, 230, 883—888.*
454. *Schwartz E. R. Fed. Proc., 1969, 28, 895.*
455. *Schwartz E. R., Reed L. J. Biochemistry, 1970, 9, 1434—1439.*

456. Schwartz E. R., Reed L. J. J. Biol. Chem., 1970, 245, 183.
457. Schwartz E. R., Old L. O., Reed L. J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1968, 31, 495—500.
458. Schweet R. S., Fuld M., Cheslock K., Pane M. H. In: A Symposium on Phosphorus Metabolism, v. 1. W. D. Mc Elroy, B. Glass (Eds). Baltimore, Johns Hopkins Press, 1951, p. 246—259.
459. Schweet R. S., Katchman B., Bock R. M., Jagaknathan V. J. Biol. Chem., 1952, 196, 563—567.
460. Scriba P., Schneider S., Holzer H. Biochim. et Biophys. acta, 1961, 54, 115—120.
461. Scrutton M. C., Utter M. F. Annual Rev. Biochem., 1968, 37, 249—302.
462. Searls R. L. Fed. Proc., 1960, 19, 36.
463. Searls R. L., Sanadi D. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1960, 2, 189—192.
464. Severin S. E., Hylowa L. S., Gomazkova V. S. Abstrs VIIIth Internat. Congr. Biochem. Switzerland, 1970, p. 117—119.
465. Severin S. E., Stepanova N. G. Ergebnisse der Experimentellen Medizin. Bd 18. Carbohydrate Metabolism in Animal Tissues and its Regulation. Berlin, Veb. Verlag Volk und Gesundheit, 1974.
466. Shapiro B. M., Ginsburg A. Biochemistry, 1968, 7, 2153—2167.
467. Shapiro B. M., Stadtman E. R. J. Biol. Chem., 1967, 242, 5069.
468. Shechter F., Blout E. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1964, 51, 695—702.
469. Shechter E., Blout E. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1964, 51, 794—800.
470. Shellman J. A. Shellman C. In: The Proteins, v. 2. H. Neurath (Ed.). New York, London, Acad. Press, 1964, p. 1—137.
471. Shen L. C., Atkinson D. E. J. Biol. Chem., 1970, 245, 5974—5978.
472. Shifrin S. Biochim. et biophys. acta, 1964, 81, 205—213.
473. Shuster L., Goldin A. J. Biol. Chem., 1958, 230, 883—887.
474. Siess E. A., Wieland O. H. Europ. J. Biochem., 1972, 26, 96—105.
475. Siess E., Wittmann L., Wieland O. Z. physiol. Chem., 1971, 352, 447—452.
476. Simpson F. J. Canad. J. Biochem. Physiol., 1960, 38, 115—124.
477. Singer T. P. Methods Enzymol., 1955, 1, 460—471.
478. Singer T. P., Pensky I. J. Biol. Chem., 1952, 196, 375—388.
479. Sluyterman L. A. A. Recueil trav. chim., 1961, 80, 989—1002.
480. Sluyterman L. A. A. Biochim. et biophys. acta, 1962, 60, 557—561.
481. Smoly J. M., Kuylenstierna B., Ernster L. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1970, 66, 125—131.
482. Söling H. D., Willms B., Friedrichs D., Kleineke J. Europ. J. Biochem., 1968, 4, 364—372.
483. Srere P. A., Cooper J. R., Klybas V., Racker E. Arch. Biochem. and Biophys., 1955, 59, 535—537.
484. Srere P., Cooper J. R., Tabachnick M., Racker E. Arch. Biochem. Biophys., 1958, 74, 295—305.
485. Stewart P. R., Quayle J. P. Biochem. J., 1967, 102, 885—897.
486. Stormer F. C. J. Biol. Chem., 1967, 242, 1756—1759.
487. Stormer F. C. J. Biol. Chem., 1968, 243, 3735—3739.
488. Stormer F. C., Solberg Y., Hovig T. Europ. J. Biochem., 1969, 10, 251—260.
489. Stormer F. C., Umbarger H. E. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964, 17, 587—592.

490. *Straus J. H., Gordon A. S., Wallack D. F. H.* Europ. J. Biochem., 1969, **11**, 201—212.
491. *Struck E., Ashmora J., Wieland O.* Biochem. Z., 1965, **343**, 107.
492. *Stryer L.* Science, 1968, **162**, 526—533.
493. *Stumpf P. K.* J. Biol. Chem., 1945, **159**, 529—544.
494. *Stumpf P. K., Zarudnaya K., Green D. E.* J. Biol. Chem., 1947, **167**, 817—825.
495. *Suchy J., Mieyal J. J., Bantle G., Sable H. Z. J.* Biol. Chem., 1972, **247**, 5905—5912.
496. *Suelter C. H.* Biochemistry, 1967, **6**, 418—423.
497. *Sundararajan T. A., Sarma P. S.* Biochem. J., 1954, **56**, 125—130.
498. *Swoboda B. E. P.* Biochim. et biophys. acta, 1969, **175**, 365—379.
499. *Takahashi K.* Vitamins, 1971, **44**, 152—158.
500. *Tanaka N., Johnson M. J. J.* Bacteriol., 1971, **108**, 1107—1111.
501. *Teufel H., Menahan L. A., Shipp J. C., Böning A., Wieland O.* Europ. J. Biochem., 1967, **2**, 182—186.
502. *Tinoco J., Wood R. W., Bradley D. F. J.* Chem. Phys., 1963, **38**, 1317—1325.
503. *Tomita I., Saiton S., Ozawa T.* Abstrs VIIIth Nikth Internat. Congr. Biochem., 1973, p. 63.
504. *Tomita I., Saiton S., Ozawa T.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, **57**, 78—84.
505. *Townend R., Kumosinski T. F., Timasheff S. N., Fasman G. D., Davidson B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1966, **23**, 163—169.
506. *Treit B., Störmer F. C.* Europ. J. Biochem., 1969, **10**, 249—250.
507. *Uhlemann H., Schellenberger A.* FEBS Lett., 1976, **63**, 37—39.
508. *Ullrich J., Deus B., Holzer H.* Internat. Z. Vitaminforsch., 1968, **38**, 274—286.
509. *Ullrich J., Donner I.* Abstrs VI Meeting FEBS. Madrid, 1969, p. 54.
510. *Ullrich J., Donner I.* Z. physiol. Chem., 1970, **351**, 1026—1029.
511. *Ullrich J., Donner I.* Z. physiol. Chem., 1970, **351**, 1030—1034.
512. *Ullrich J., Kempele M.* FEBS Lett., 1969, **4**, 273—274.
513. *Ullrich J., Manuschreck A.* Biochim. et biophys. acta, 1966, **115**, 46—53.
514. *Ullrich J., Mannschreck A.* Europ. J. Biochem., 1967, **1**, 110—116.
515. *Ullrich J., Ostrovsky Y. M., Eyzaguirre J., Holzer H.* Vitamins and Hormones, 1971, **28**, 365—398.
516. *Ullrich J., Wittorf J. H., Gubler C. J.* Biochim. et biophys. acta, 1966, **113**, 595—604.
517. *Ullrich J., Wittorf J., Gubler C.* FEBS Lett., 1969, **4**, 275—277.
518. *Ullrich J., Wollmer A.* Z. physiol. Chem., **352**, 1971, 1635—1644.
519. *Ulmer D. D.* Biochim. et biophys. acta, 1969, **181**, 305—310.
520. *Umbarger H. E.* Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1961, **26**, 301—312.
521. *Umbarger H. E., Brown B. J.* Biol. Chem., 1958, **233**, 1156—1160.
522. *Uyeda K., Rabinowitz J. C.* Fed. Proc., 1967, **26**, 561.
523. *Uyeda K., Rabinowitz J. C.* J. Biol. Chem., 1971a, **246**, 3111.
524. *Uyeda K., Rabinowitz J. C.* J. Biol. Chem., 1971b, **246**, 3120—3125.
525. *Varga J. M., Horvath I. J.* Mol. Biol., 1965, **13**, 596—599.
526. *Velick S., Hayes J. E. J.* Biol. Chem., 1953, **203**, 545—562.
527. *Velluz L., Amiard G., Bartos J. J.* Biol. Chem., 1949, **180**, 1137—1145.

528. Vennesland B. *The Enzymes*, 1951, 2, 183—215.
529. Villafranca J. J., Axelrod B. J. *Biol. Chem.*, 1971, 246, 3126—3131.
530. Vodrazka L., Pristoupilova K. *Collect. Czechosl. Chem. Commun.*, 1958, 23, 752—758.
531. Vogel O., Henning U. *Europ. J. Biochem.*, 1971, 18, 103—115.
532. Votaw R. G., Krampitz L. O. *Fed. Proc.*, 1966, 25, 342.
533. Votaw R., Williamson W. T., Krampitz L. O., Wood W. A. *Biochem. Z.*, 1963, 338, 756—762.
534. Wallach D. F., Zahler P. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1966, 56, 1552—1559.
535. Walsh D. A., Perkins J. P., Krebs E. G. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 3763—3764.
536. Walter P., Paetkan V., Lardy H. A. *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 2523—2532.
537. Wedding R. T., Black M. K. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 1638—1643.
538. Wedding R. T., Black M. K. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 4097—4099.
539. Weil L. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1965, 110, 57—68.
540. Weil L., Lordon G., Buchert A. R. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1951, 33, 90—109.
541. Weil L., Maher J. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1950, 29, 241—259.
542. Weil L., Seibles T. S., Herskovits T. T. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1965, 111, 308—320.
543. Westhead E. W. *Biochemistry*, 1965, 4, 2139—2144.
544. White F. H. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 383—389.
545. White F. H. *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 1353—1360.
546. White W. D., Drago R. S. *Inorg. Chem.*, 1971, 10, 2727—2735.
547. Wieland O., Jagow-Westermann B. *FEBS Lett.*, 1969, 3, 271—274.
548. Wieland O., Jagow-Westermann B., Stukowski B. *Z. physiol. Chem.*, 1969, 350, 329—334.
549. Wieland O., Siess E. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1970, 65, 947—954.
550. Wieland O., Siess E., Schulze-Wethmar F. H., Funcke H. G., Winton B. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1971, 143, 593—601.
551. Wiesner K., Valenta Z. *Experientia*, 1956, 12, 190—193.
552. Wiethoff E. O., Leppla W., Holf C. V. *Biochem. Z.*, 1957, 328, 576—580.
553. Williamson J. R., Kreisberg R. A., Felts P. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1966, 56, 247—254.
554. Wittorf J., Gubler C. J. *Europ. J. Biochem.*, 1970, 14, 53—60.
555. Wittorf J. H., Gubler C. J. *Europ. J. Biochem.*, 1971, 22, 544—550.
556. Wojtczak L., Duszynski J., Komosinska M., Wojtczak A. B. *Abstrs IX Internat. Congr. Biochem. Stockholm, 1973*, p. 351.
557. Yamasaki H., Moriyama T. *Biochim. et biophys. acta*, 1971, 242, 637—647.
558. Yang J. T., Doty P. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1967, 79, 761—775.
559. Yatco-Manzo E., Roddy F., Yount R. G., Metzler D. E. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 733—737.
560. Yount R. G., Metzler D. E. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 738—741.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Введение . . . . .                                                                 | 3   |
| <i>Глава первая.</i>                                                               |     |
| Краткая характеристика реакций, катализируемых<br>тиаминовыми ферментами . . . . . | 8   |
| <i>Глава вторая.</i>                                                               |     |
| Механизм действия тиаминовых ферментов . . .                                       | 18  |
| <i>Глава третья.</i>                                                               |     |
| Ингибиторы . . . . .                                                               | 38  |
| <i>Глава четвертая.</i>                                                            |     |
| Структура тиаминовых ферментов . . . . .                                           | 46  |
| <i>Глава пятая.</i>                                                                |     |
| Функциональные группы . . . . .                                                    | 70  |
| <i>Глава шестая.</i>                                                               |     |
| Кофакторы . . . . .                                                                | 88  |
| <i>Глава седьмая.</i>                                                              |     |
| Взаимодействие кофакторов с тиаминовыми фер-<br>ментами . . . . .                  | 103 |
| <i>Глава восьмая.</i>                                                              |     |
| Активный центр . . . . .                                                           | 133 |
| <i>Глава девятая.</i>                                                              |     |
| Регуляция . . . . .                                                                | 156 |
| Заключение . . . . .                                                               | 201 |
| Литература . . . . .                                                               | 216 |

*Герман Александрович Кочетов*  
**ТИАМИНОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ**

Утверждено к печати Научным советом по проблемам  
биохимии животных и человека Академии наук СССР  
Редактор издательства Г. В. Красильников. Художник В. Е. Самохил.  
Художественный редактор И. К. Капранова. Технический редактор  
Р. М. Денисова. Корректоры Н. И. Кодыкова, В. С. Федечкина.

ИБ № 7271

Сдано в набор 22.11.77. Подписано к печати 09.02.78. Т-00339. Формат 84×108<sup>1</sup>/<sub>32</sub>.  
Гарнитура литературная. Печать высокая. Бумага типографская № 1.  
Усл. печ. л. 12,18. Уч.-изд. л. 12,5. Тираж 1450 экз. Тип. зак. 4815. Цена 1 р. 80 к.  
Издательство «Наука», 117485, Москва, В-485, Профсоюзная ул., 94а.  
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 10